

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ «КИЇВСЬКИЙ
ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПРИЛУЦЬКИЙ МАКСИМ ПЕТРОВИЧ

УДК:547.415.5:[616 006.6:612.6]

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЗРОБКА БІОСЕНСОРНИХ ПЛАТФОРМ ТА БАЗОВИХ
АЛГОРИТМІВ АНАЛІЗУ ДЛЯ ЕКСПРЕСНОЇ ДІАГНОСТИКИ РАКУ
ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ В УМОВАХ *IN VITRO***

03.00.20 – «Біотехнологія»
(біологічні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____М. П. Прилуцький

Науковий керівник:

Стародуб Микола Федорович,
доктор біологічних наук, професор

Київ 2020

АНОТАЦІЯ

Прилуцький М. П. Розробка біосенсорних платформ та базових алгоритмів аналізу для експресної діагностики раку грудної залози в умовах *in vitro*. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.20 «біотехнологія». Національний технічний університет України "Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського", 2020р.

В дисертації описано розробку методики визначення поліамінів в культурі клітин лінії MCF-7 та в сироватці крові хворих на рак грудної залози. В дисертації показано вивчення біологічних властивостей поліамінів, як потенційних маркерів раку грудної залози. Окрім того, порівняно декілька типів біосенсорних пристроїв, в яких використаний різний підхід до сенсibiliзації чутливої поверхні перетворювача, а також порівняно декілька типів трансдюсерної поверхні для визначення найчутливішої біосенсорної платформи.

Рак грудної залози займає 1-ше місце у загальній структурі злоякісних пухлин серед жінок. Захворюваність коливається від 50-60 на 100 тис. жіночого населення (Англія, Данія, Нідерланди, США, Канада, Україна) до 200-500 чол. (Японія, Мексика). В структурі онкологічної захворюваності в Україні РМЗ займає перше місце. Найбільший показник смертності на 100 тис. населення є в Англії - 36,0, на Мальті - 35,5, а також у Данії - 34,5. Найнижча смертність відмічалась у Перу - 5,6, в Японії - 6,7 та в Еквадорі - 6,5 на 100 тис. населення [33].

В Україні на протязі десяти останніх років рак грудної залози залишається медико-біологічною і соціально-економічною проблемою охорони здоров'я України, актуальність якої зростає в зв'язку з радіаційним забрудненням великих територій України внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС. Щорічно в Україні реєструється понад 16 тис. нових випадків раку

грудної залози, з них 24,5 % складають жінки репродуктивного віку. Щороку помирає понад 7,8 тис. жінок, з них понад 20 % — в репродуктивному віці. Рівень захворюваності на РМЗ за останні 30 років зріс в 2,5 рази, щорічний приріст при цьому складає 7,1 %. Пікових значень рівень захворюваності на рак грудної залози набуває у віці 55-59 та 70-74 років [32]. Кожна третя жінка, у якої виявлено рак грудної залози, помирає протягом року з моменту встановлення діагнозу. Щорічно у світі від раку грудної залози вмирає 41 тисяча жінок. Захворюваність на рак грудної залози має стабільний приріст у всіх вікових групах жіночої популяції України. Щорічно реєструється понад 17,7 тисяч нових випадків хвороби, а на обліку онкологічних установ знаходяться 163,3 тисяч хворих. Протягом останніх 25 років рак грудної залози займає перше місце в структурі онкологічної захворюваності жінок України. За уточненими даними Національного канцер реєстру, в 2013 році питома вага цієї патології склала 22,2% [32].

Спочатку, за допомогою літературних даних було проаналізовано декілька типів біосенсорів і вирішено проводити основну серію досліджень з використанням біосенсора на основі явища поверхневого плазмонного резонансу.

На початку досліджень для створення ефективної біосенсорної платформи було вирішено протестувати декілька алгоритмів аналізу з використанням біосенсора, аби визначити найчутливіший та наефективніший. Серед усіх використаних алгоритмів аналізу найвищу ефективність показав прямий алгоритм аналізу, за якого специфічні антитіла та поліаміни іммобілізували безпосередньо на поверхні перетворювача без додаткової модифікації поліамінів (різниця зсуву резонансного кута при концентрації в 1000 нг/мл у сперміну становить 0,55 градусів, у спермідину – 0,19 градусів, а у путресцину – 0,13 градусів). У разі використання алгоритму аналізу «до насичення» було отримано значно менші значення зсуву резонансного кута (зсув резонансного кута при концентрації в 1000 нг/мл у сперміну становить 0,2 градуси, у спермідину – 0,12 градусів, а у путресцину

– 0,11 градусів). Застосування конкурентного алгоритму аналізу з одночасним включенням проміжного шару з ПАГ сприяло подальшому підвищенню рівня детермінації поліамінів, оскільки при його застосуванні було отримано кращі результати, ніж при використанні алгоритму аналізу «до насичення», але гірші за прямий алгоритм аналізу (зсув резонансного кута при концентрації в 1000 нг/мл у сперміну становить 0,38 градусів, у спермідину – 0,16 градусів, а в путресцину – 0,14 градусів).

Наступним етапом стало визначення меж чутливості біосенсора з прямим алгоритмом аналізу. Оптичний біосенсор на основі явища поверхневого плазмонного резонансу здатний визначати поліаміни, такі як спермін і спермідин в діапазоні концентрацій від 5 до 1000 нг/мл.

Модифікація поверхні перетворювача такими речовинами як БСА, білок А та ПАГ дозволяє збільшити чутливість поверхні трансдюсера, зорієнтувати антитіла специфічними до поліамінів ділянками, та заблокувати неспецифічні місця зв'язування на поверхні перетворювача за допомогою БСА. При аналізі модельних розчинів поліамінів спермін проявив більшу спорідненість до антитіл при утворенні комплексу антиген-антитіло, оскільки кут відхилення у сперміну значно вищий, ніж у спермідину. Так при концентрації в 100 нг/мл резонансний кут становив 62,51 градуси у спермідину проти 62,65 градусів у сперміну. При концентрації 250 нг/мл резонансний кут у спермідину склав 62,59 градусів проти 62,90 у сперміну. При концентрації 500 нг/мл резонансний кут у спермідину склав 62,68 градусів проти 63,09 у сперміну. При концентрації 1000 нг/мл резонансний кут у спермідину склав 62,75 градусів проти 63,16 у сперміну. Також було проведено дослідження на біосенсорі, який використовував не явище ППР, а властивості наночастинок оксиду цинку (ZnO) щодо фотолюмінесценції після обробки лазерним випромінюванням. Фотолюмінесценція може згасати або зростати, в залежності від молекул імобілізованих на чутливому шарі наночастинок ZnO.

Зміни фотолюмінесценції можна було спостерігати як при аналізі сперміну так і спермідину, а також при аналізі культури клітин MCF-7. Інтенсивність люмінесценції поступово знижується з введенням нової концентрації зразків, при чому інтенсивність люмінесценції значно вища на початкових концентраціях при дослідженні культури клітин.

При порівнянні двох типів трансдюсерів біосенсорів визначили, що трансдюсер, як на основі наночастинок ZnO, так і золота, здатний визначати як спермін у розчині в різних концентраціях так і в суспензії культури клітин лінії раку грудної залози людини MCF-7. Сенсограми отриманих даних дозволяють спостерігати поступове збільшення концентрації сперміну, як в розчині так і в суспензії культури клітин. В результаті аналізу отриманих даних можна спостерігати, що поліаміни краще визначаються біосенсором, де в якості перетворювача сигналу використовується трансдюсер із золотим напиленням, і зсув резонансного кута знаходиться в діапазоні від $63,11 \pm 0,0043$ до $63,56 \pm 0,0049$ градусів що відповідає концентраціям від 5 до 100 нг/мл і чіткіший від відгуку при використанні пластинки з наночастинками ZnO. При концентрації від 500 до 1000 нг/мл можна спостерігати чіткіший відгук у біосенсора з пластинкою, обробленою наночастинками ZnO, де відгук біосенсора знаходиться в межах від $64,50 \pm 0,0055$ до $67,10 \pm 0,0063$. При аналізі ефективності визначення поліамінів у суспензії клітин MCF-7 дослідили, що, як і у випадку з попереднім дослідом біосенсор на основі золотої пластинки визначає наявність поліамінів краще в меншій кількості клітин в діапазоні від 100 до 500 кл/мл і знаходиться в діапазоні між $64,38 \pm 0,0050$ та $64,82 \pm 0,0057$, що більше у порівнянні з відгуком біосенсора на пластинці з наночастинками ZnO в 1,5–2 рази. Надалі, при зростанні кількості клітин спостерігали підвищення чіткості відгуку на пластинці з наночастинками ZnO в діапазоні концентрацій від 1000 до 100 000 кл/мл. Зсув резонансного кута знаходиться в межах від $67,20 \pm 0,0069$ до $75,14 \pm 0,0078$. Проаналізувавши отримані результати можна сказати, що обидва біосенсори показали достатню ефективність і здатні визначати наявність та

концентрацію поліамінів як у розчині, так і в суспензії клітин раку грудної залози MCF-7, однак, оскільки в лабораторній діагностиці першочерговим є виявлення патологічних процесів на ранніх етапах, і, як результат, вчасна протидія захворюванню, рекомендованим є в подальшому застосування біосенсора з перетворювачем, вкритим частинками золота, оскільки саме він здатен виявляти спермін краще в концентраціях від 5 до 100 нг/мл і в концентрації клітин MCF-7 від 100 до 500 кл/мл.

Надалі було порівняно ефективність новоствореної методики біосенсорного аналізу з біосенсором на основі фотолюмінесценції оксиду цинку. Біосенсор на основі явища поверхневого плазмонного резонансу виявився кращим у індикації поліамінів у модельних розчинах та культурі клітин лінії раку грудної залози людини MCF-7 на 14-30% порівняно з біосенсором на основі фотолюмінесценції оксиду цинку.

На останньому етапі досліджень було встановлено, що зсув резонансного кута в контрольних сироватках крові не перевищував меж 62,9–63,2 градуса. Ці значення корелюють з концентрацією поліамінів від 5 до 10 нг/мл. В результаті проведених досліджень було визначено, що концентрація поліамінів у зразках крові хворих на рак грудної залози перебувала в діапазоні від 20 до 100 нг/мл, що перевищує фізіологічні рівні. Концентрація поліамінів у контрольній групі не перевищувала $7 \pm 0,61$ нг/мл, тоді як концентрація поліамінів у групі з розміром пухлини менше 2,5 см не перевищувала $27,2 \pm 1,90$ нг/мл. У групі з розміром пухлини більше 3,8 см концентрація поліамінів не перевищувала $55,3 \pm 2,60$ нг/мл, а в групі з розміром пухлини більше 5 см не перевищувала $125,1 \pm 2,11$ нг/мл. За отриманими результатами розроблений біосенсорний метод дозволяє виявити як низькі, так і високі концентрації поліамінів.

Зсув резонансного кута біосенсора при порівнянні різних вікових груп, поступово зростає зі збільшенням віку пацієнтів, але й залежить від розміру пухлини, тому що зсув резонансного кута більший у пацієнтів з більшим розміром пухлини.

Новостворена біосенсорна платформа може виявляти поліаміни в розчині та в культурі клітин *in vitro* в дуже малих концентраціях, а також в сироватці крові та може бути рекомендований для подальшого вдосконалення та використання.

Ключові слова: поліаміни, ППР, біосенсиори, наночастинки, трансдюсер, спермін, спермідин, путресцин.

SUMMARY

Prylutskyi M. P. Development of biosensor platforms and basic analysis algorithms for express diagnostics of breast cancer *in vitro*. – the Manuscript

Dissertation for a Candidate Degree in Biology in the speciality 03.00.20 "Biotechnology". National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", 2020.

The dissertation describes the development of a technique for the determination of polyamines in cell culture of MCF-7 cells and in the serum of breast cancer patients. The dissertation shows the study of the biological properties of polyamines as potential markers of breast cancer. In addition, there are comparison of several types of biosensor devices that take a different approach to sensibilization of the transducer sensitive surface, as well as comparison of several types of transducer surfaces for determination the most sensitive biosensor platform.

Breast cancer is ranked 1st in the overall cases of malignancies among women. The incidence ranges from 50-60 per 100,000 women (England, Denmark, Netherlands, USA, Canada, Ukraine) to 200-500 (Japan, Mexico). In the structure of oncological morbidity in Ukraine, breast cancer occupies the first place. The highest death rate per 100,000 population is in England – 36,0, in Malta – 35,5, and in Denmark – 34,5. The lowest mortality was recorded in Peru – 5,6, in Japan – 6,7 and in Ecuador – 6,5 per 100 000 population [33].

In the last ten years, breast cancer in Ukraine remains a medical, biological and socio-economic healthcare problem of Ukraine, the urgency of which is increasing due to radiation contamination of large territories of Ukraine due to the Chernobyl accident. Over 16 000 of breast cancer's new cases are reported annually in Ukraine, 24,5% of which are women of reproductive age. More than 7800 women die each year, more than 20% of which are women in reproductive age. The incidence of breast cancer in the last 30 years has increased 2.5 times, with an annual increase of 7,1%. Peak rates of breast cancer cases are in age 55-59

and 70-74 years old [32]. One in three women who have breast cancer die within a year after being diagnosed. 41 000 of women die of breast cancer annually in the world. The incidence of breast cancer has a steady increase in all age groups of the female population of Ukraine. More than 17,7 thousand new cases are registered annually, and 163,3 thousand patients are registered by the oncological institutions. For the last 25 years, breast cancer has been ranked first in the structure of cancer incidence of women in Ukraine. According to the National Cancer Registry, in 2013 the incidence of this pathology was 22,2% [32].

Initially, several types of biosensors were analyzed using literature data, and it was decided to conduct a major series of studies using a biosensor based on the phenomenon of surface plasmon resonance.

At the beginning of the research, it was decided to test several algorithms of analysis to validate the most sensitive and effective one to create an effective biosensor platform.

Among all the analysis algorithms used, the direct efficiency algorithm showed the highest efficiency, in which specific antibodies and polyamines were immobilized directly on the surface of the transducer without additional modification of the polyamines (the difference of the resonance angle shift at concentration of 1000 ng/ml in spermine is 0,55 degrees 0,19 degrees and putrescine 0.13 degrees). In the case of the "saturation" analysis algorithm, much smaller values of the resonance angle shift were obtained (the shift of the resonant angle at a concentration of 1000 ng/ml in spermine was 0,2 degrees, in spermidine - 0,12 degrees, and in putrescine - 0,11 degrees). The use of a competitive analysis algorithm with the simultaneous inclusion of an intermediate layer of PAG contributed to a further increase in the sensitivity to polyamines, since its application yielded better results than using the algorithm "saturation", but worse than the direct analysis (shift of resonance angle in concentration of 1000 ng/ml in spermine is 0,38 degrees, in spermidine - 0,16 degrees, and in putrescine - 0,14 degrees).

The next step was to determine the sensitivity limits of the biosensor with a direct algorithm of analysis. An optical biosensor based on the phenomenon of surface plasmon resonance is capable of detecting polyamines such as spermine and spermidine in the concentration range from 5 to 1000 ng.

Modification of the transducer surface by substances such as BSA and protein A and PAG can increase the sensitivity of the transducer surface, orient antibodies specific to polyamine sites, and block non-specific binding sites on the transducer surface by BSA.

In the analysis of model solutions of polyamines spermine showed a greater affinity for antibodies in the formation of the antigen-antibody complex, since the shift of resonance angle of spermine is much higher than that of spermidine. Furthermore at a concentration of 100 ng/ml the resonance angle was 62,51 degrees in spermidine and 62,65 degrees in spermine. At a concentration of 250 ng/ml the resonance angle in spermidine was 62,59 degrees and 62,90 in spermine. At a concentration of 500 ng/ml the resonance angle in spermidine was 62.68 degrees against 63.09 in spermine. At a concentration of 1000 ng/ml the resonance angle in spermidine was 62.75 degrees against 63.16 in spermine.

There was also conducted a study on a biosensor using the properties of zinc oxide nanoparticles (ZnO) but not the surface plasmon resonance phenomenon, with respect to photoluminescence after laser treatment. Photoluminescence can attenuate or increase, depending on the molecules immobilized on a sensitive layer of ZnO nanoparticles.

Changes in photoluminescence could be observed, both in the analysis of spermine and spermidine. And also in the analysis of cell culture MCF-7. The luminescence intensity gradually decreased with the introduction of a new concentration of samples, with the luminescence intensity is much higher at the initial concentrations of cell culture than in model solutions.

Comparing the two types of biosensor transducers, both based on ZnO nanoparticles and gold was able to determine both the spermine polyamines in model solution and suspensions of MCF-7 human breast cancer cell culture at

different concentrations. Sensograms of the obtained data allow us to observe a gradual increase in the concentration of spermine, both in solution and in the suspension of cell culture. It can be observed that the sensitivity range determined by the biosensor fluctuates from 5 to 1000 ng/ml for spermine and from 100 to 100000 cells/ml for MCF-7 cell suspension.

The biosensor based on the effect of surface plasmon resonance turned out to be the best in the determination of polyamines in model solutions and cell culture of the human breast cancer cell line MCF-7 by 14-30% in comparison with the biosensor based on photoluminescence of zinc oxide

On the next stage the efficiency of ZnO and gold-based transducers was compared. As a result of the analysis of the obtained data, it can be observed that low concentrations of spermine are better determined by the biosensor, where the transducer with a gold coating is used as a signal transducer and is in the range from 63.11 ± 0.0043 to 63.56 ± 0.0049 degrees which corresponds to concentrations from 5 to 100 ng/ml and gives more clear signal comparing with ZnO transducer. At a concentration of 500 to 1000 ng/ml, a clearer response can be observed in a biosensor with a plate treated with ZnO nanoparticles where the biosensor response is in the range of 64.50 ± 0.0055 to 67.10 ± 0.0063 degrees and determines the presence and concentration of polyamines clearer comparing with golden transducer-based biosensor. Analyzing the effectiveness of the determination of polyamines in the suspension of cells MCF-7 cell line, was investigated that, as in the case of previous experiments, a biosensor based on a gold plate transducer determines the presence of polyamines in fewer number cells in the range from 100 to 500 cells/ml and is in the range from $64, 38 \pm 0.0050$ to 64.82 ± 0.0057 degrees, which is higher than the response of the biosensor on the transducer with ZnO nanoparticles. Further, with increase of cell number, there was an increase in the clarity of response on the plate with ZnO nanoparticles in the concentration range from 1000 to 100 000 cells/ml in 1,10-1,13 times compared with the biosensor on the plate coated with a layer of gold. The shift of the resonance angle is in the range from 67.20 ± 0.0069 to 75.14 ± 0.0078 degrees.

Having analyzed the results it can be made an assumption that both biosensors have shown sufficient efficiency and are able to determine the presence and concentration of polyamines both in solution and in the suspension of breast cancer MCF-7 cell line.

On the last stage of the experiment it was found that the shift of the resonant angle in the control serum did not exceed the limits of 62.9-63.2 degrees. These values correlate with a concentration of polyamines of 5 to 10 ng/ml. Studies have shown that the concentration of polyamines in the blood samples of breast cancer patients ranged from 20 to 100 ng/ml, exceeding physiological levels. The concentration of polyamines in the control group did not exceed 7 ± 0.61 ng/ml, while the concentration of polyamines in the group with tumor size less than 2.5 cm did not exceed 27.2 ± 1.90 ng / ml. In the group with tumor size greater than 3.8 cm, the concentration of polyamines did not exceed 55.3 ± 2.60 ng/ml, and in the group with tumor size greater than 5 cm did not exceed 125.1 ± 2.11 ng/ml. According to the obtained results, the developed biosensor method allows to detect both low and high concentrations of polyamines. The shift of the resonant angle of the biosensor during comparison of different age groups, gradually increases with increasing age of the patients, but also depends on the size of the tumor, because the shift of the resonant angle is larger in patients with a larger tumor size.

The newly created biosensor platform can detect polyamines in solution and in cell culture *in vitro* at nanomolar concentrations as well as in serum and may be recommended for further improvement and use.

Keywords: polyamines, SPR, biosensors, nanoparticles, transducer, spermine, spermidine, putrescine.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України

1. Прилуцький М. П., Стародуб М.Ф. «Якісний та кількісний аналіз поліамнів сперміну та спермідину, як маркерів раку грудної залози з використанням біосенсора на основі ППР»/ М. П. Прилуцький, М.Ф. Стародуб М.Ф. // Наукові записки НАУКМА. -2017. - с.-62-68.

Статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних

2. **Prylutskyi M. P., Starodub M. F.** Polyamine analysis in solution and culture in vitro using the immunobiosensor on the basis of ZnO nanoparticles for early diagnostics of oncological diseases/ M. F. Starodub, M. P. Prylutskyi // Experimental oncology. – 2019. – Т. 41. - № 4. - P. 1-3.
3. **Prylutskyi M. P.** et al. Express control of levels of polyamines by immune biosensor based on SPR / M. P. Prylutskyi, N. F. Starodub, T. S. Lebyedyeva, P. B. Shpylovyi//Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv-Problems of Physiological Functions Regulation. – 2018. – V. 25. – № 2. – P. 59-63.
4. **Prylutskyi, M. P., Bilko, N. M., Starodub, N. F.** Detection of biogenic polyamines in blood of patients with breast cancer / M. P. Prylutskyi, N. M. Bilko, N. F. Starodub// Regulatory Mechanisms in Biosystems. – 2019. – V. 10. - № 2 – P. 257-263.
5. **Прилуцький М. П., Стародуб М. Ф., Феделеш-Гладинець М. І.** Порівняння ефективності імунобіосенсорів на основі золота та наночастинок ZnO за аналізу рівнів сперміну в культурі клітин *in vitro*/ **М. П. Прилуцький, М. Ф. Стародуб, М. І. Феделеш-Гладинець**// Біологічні системи теорія та інновації. – 2019. – Т. 10. - № 4. – с. 22-30

Статті у фахових іноземних виданнях

6. **Prylutskyi M.**, Starodub N., Bilko N. “Determination of the Concentration of Polyamines with SPR-based Immune Biosensor for Early Diagnostics of Breast Cancer” / **M. Prylutskyi** , N. Starodub, N. Bilko //Biosensors&Bioelectronics.- 2016.- V.7.- № 4.- P.1-10

Патенти

7. **Прилуцький М. П.**, Стародуб М. Ф, Білько Д. І. Патент на корисну модель 118303, МПК: G01N 33/483 G01N 33/547, G01N 33/574 G01N 21/66. Спосіб визначення поліамінів для експресної діагностики раку грудної залози в умовах *in vitro*; заявлено 06.04.2017; опубліковано 25.07.2017; Бюл. № 14

Тези наукових доповідей

8. **Prilutskiy M. P.** Efficiency of the SPR-based immune biosensor at the express determination of polyamines.ІІІ міжнародна науково-практична конференція «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології» 22-23 жовтня 2015 року. м. Київ
9. **Prilutskiy M.**, Starodub N. F., T. S., Lebededeva, P. Shplylovyy “Non-labeled immune biosensor for express control of spermine and spermidine levels”, «Біотехнологія: звершення та надії 22-24 травня 2015 року. м. Київ
10. **Прилуцький М. П.**, Стародуб М. Ф. Оптичний імунобіосенсорний підхід для експресного визначення рівня поліамінів при ранній діагностиці раку грудної залози. 7-а Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» 30 травня – 3 червня 2016 року. м. Одеса.
11. **Прилуцький М. П.**, Стародуб М.Ф. «Імунобіосенсорний аналіз онкобіохімічних маркерів сперміну та спермідину в системі *in vitro*».

Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Профілактика неінфекційних захворювань: фокус на коморбідність». 3 листопада 2017 року, м. Харків.

12. **Prylutskyi M. P, Starodub N. F.** Analysis of polyamine levels in blood serum of patients with breast cancer using optical SPR-based immune biosensor. “International scientific conference on medicine”, 22 лютого 2019 року. м. Рига, Латвія.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	20
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	26
1.1. Основні характеристики, особливості розвитку та фактори ризику РГЗ.....	26
1.2. Діагностика раку грудної залози.....	33
1.2.1. Діагностичні маркери раку грудної залози.....	33
1.2.2. Поліаміни в якості пухлинних маркерів.....	35
1.2.3. Структура та властивості поліамінів.....	37
1.3. Біологічні сенсори: класифікація та застосування.....	40
1.3.1. Загальна характеристика біосенсорів та їх різновиди.....	40
1.3.2. Способи функціоналізації поверхні біосенсорів.....	42
1.3.3. Імуносенсори на основі поверхневого плазмонного резонансу та їх застосування.....	46
1.3.4. Модифікація поверхні трансдюсера біосенсора на основі ППР.....	50
1.3.5. Застосування ефекту ППР в біосенсорах та імуносенсорах.....	51
1.3.6. Способи функціоналізації поверхні біосенсорів, заснованих на ефекті поверхневого плазмонного резонансу (ППР).....	52
Висновки до огляду літератури.....	59
2. ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	61
2.1. Матеріали.....	61
2.2. Культивування культури клітин лінії MCF-7.....	61

2.3. Характеристика основних робочих параметрів біосенсора на основі ефекту ППР.....	62
2.4. Попередня модифікація чутливої поверхні.....	63
2.5. Освоєння роботи імуносенсору із запропонованим біочіпом	64
2.6. Підготовка біосенсорної поверхні при модифікації пластинки наночастинками ZnO.....	66
2.7. Процедура аналізу з використанням біосенсора на основі ППР.....	68
2.8. Статистична обробка результатів дослідження.....	72
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	73
3.1 Розробка імуносенсорної тест-системи.....	73
3.1.1. Підготовка компонентів чутливої поверхні трансдюсера імунного біосенсора.....	73
3.1.2. Проведення імуноаналізу за допомогою ППР.....	74
3.2 Визначення алгоритму аналізу	76
3.3. Визначення оптимальної концентрації поліамінів в модельних розчинах.....	79
3.4. Побудова калібрувальної кривої для визначення межі чутливості біосенсора на основі ППР з використанням поліамнів сперміну.....	83
3.5. Культивування культури клітин MCF-7 для подальшого проведення біосенсорного експрес-тесту.....	86
3.6. Визначення поліамінів у модельних розчинах та культурі клітин лінії MCF-7.....	88
3.7. Порівняння ефективності біосенсорів з перетворювачем на основі наночастинок ZnO та Au.....	93
3.8. Порівняння ефективності біосенсора на основі ППР та ZnO.....	96

3.9. Відпрацювання розробленої біосенсорної методики та визначення зсуву резонансного кута поліамнів у контрольних зразках сироватки крові.....	98
3.10. Визначення концентрації поліамнів у зразках сироватки крові хворих на рак грудної залози.....	101
3.11 Аналіз отриманих результатів.....	103
Висновки до результатів дослідження.....	104
4. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	106
ВИСНОВКИ.....	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	122
ДОДАТКИ.....	132

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БСА	Бичачий сироватковий альбумін
ПАГ	Поліаліламінігідрохлорид
ПЛР	Полімеразно-ланцюгова реакція
ППР	Поверхневий плазмон ний резонанс
РГЗ	Рак грудної залози
РЕА	Раковий ембріональний антиген
РК	Резонансний кут
СА 15-3	Раковий антиген 15-3
PBS	Фосфатно-сольовий буфер

ВСТУП

Актуальність теми. Велика кількість опублікованих досліджень *in vitro*, зосереджена на використанні клітинної лінії раку грудної залози людини MCF-7 у діагностиці даного захворювання [Vantangoli M. et al. 2015]. Ріст пухлини, переважно зумовлений системними порушеннями клітинного і гуморального імунітету з превалюванням таких процесів, як: активація клітин-супресорів, підвищення рівня інгібуючих процесів у крові, пригнічення ендокринної функції тимуса, посилення глюкокортикоїдної функції коркової речовини надниркових залоз [Маєвський О. Є. 2014]. Проблема своєчасного виявлення процесів матігназації полягає у відсутності надійних методик для раннього виявлення неопластичного процесу (Михайлович Ю.Й 2012; Федоренко З. П., 2015). Сучасні методи детекції біомаркерів раку грудної залози, такі як імуноферментний аналіз та полімеразна ланцюгова реакція трудомісткі та високо затратні (Білінський Б. Т., 2010). Однак сьогодні вже є методики, значно простіші у використанні, дешевші та точніші за згадані вище. Наприклад, доволі перспективним вважається використання біосенсорів, які можуть детектувати специфічні молекули в дуже низьких концентраціях, використовуючи специфічні антитіла до маркерів, характерних для певних видів раку. [Monteiro et al., 2015]. У розвинених країнах світу використання біосенсорів у діагностиці онкологічних захворювань є доволі поширеним (Mittal S. 2017). Біосенсиори дозволяють виявляти низькомолекулярні сполуки і використовуються у сучасній діагностичній практиці онкологічних захворювань (Сергеева Т. А., Єльська Г. В., 2016). Так, для діагностики різних видів раку широко використовують методи, які базуються на детекції біомаркерів – молекул, специфічних до певних типів клітин [Осинський С. П., 2010]. Зокрема помічено, що поліаміни є ефективними біомаркерами для діагностики онкологічних захворювань (Soda K., 2011; Samoilenko O. A., Zaletok S. P., 2015). Поліаміни - ендогенні алифатичні полікатіони, які синтезуються в

клітинах і використовуються у якості пухлинних маркерів (Щербіна О. В., 2008). Збільшення кількості злоякسنних клітин призводить також до зростання кількості поліамінів в крові [Залеток С. П., Бердинских Н.К. 1984]. Для покращення якості діагностики онкозахворювань вчені використовують методики визначення поліамінів з використанням біосенсорів (Zaletok S. P., 2004). Отже, прогностичні біомаркери, зареєстровані в ході трансформації клітин, можуть слугувати потенційними діагностичними засобами. В якості таких прогностичних маркерів дуже перспективно виглядають поліаміни, такі як спермін і спермідин.

Саме тому розробка нових біосенсорних методик для діагностики раку грудної залози на сьогодні є актуальною та необхідною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є складовою державної теми кафедри лабораторної діагностики біологічних систем Національного університету «Києво-Могилянська академія» «Розробка біосенсорних платформ та базових алгоритмів аналізу для експресної діагностики раку грудної залози людини в умовах *in vitro*» (номер державної реєстрації 0116U004703, 2016–2018 рр.); науково-дослідної роботи кафедри лабораторної діагностики біологічних систем, Національного університету «Києво-Могилянська академія», яка була частиною проекту міжнародного науково-технічного співробітництва Україна-Латвія «Пошук базового ефективного алгоритму біосенсорного експрес-контролю біохімічних параметрів розвитку онкологічного ураження та ефективності його лікування» (номер державної реєстрації : 0117 U005082, 2017–2018 рр.).

Об'єкт дослідження: визначення кількісного та якісного складу поліамінів в клітинах раку грудної залози в умовах *in vitro*, а також в зразках крові хворих на рак грудної залози за допомогою імунобіосенсорного аналізу на основі явища поверхневого плазмонного резонансу.

Предмет дослідження: біогенні поліаміни, культура клітин раку грудної залози та сироватка крові хворих на рак грудної залози, постановка

імуноаналізу за допомогою біосенсора на основі явища поверхневого плазмонного резонансу для експрес-визначення біогенних поліамінів.

Мета. Створення та відпрацювання ефективної методики якісного та кількісного імунобіосенсорного аналізу поліамінів в культурі клітин *in vitro* та зразках сироватки крові хворих на рак грудної залози з використанням біосенсору на основі явища поверхневого плазмонного резонансу.

Завдання

1. Визначити найбільш ефективний алгоритм аналізу при підготовці чутливої поверхні біосенсора
2. Визначити межі чутливості біосенсора з використанням модельних розчинів поліамінів та побудувати калібрувальні криві.
3. Провести аналіз поліамінів на лінії MCF-7 в культурі клітин *in vitro*
4. Порівняти ефективність визначення поліамінів в модельних розчинах та культурі клітин з використанням різних типів трансдюсерів
5. Провести якісний та кількісний аналіз поліамінів у сироватці крові пацієнтів хворих на рак грудної залози та порівняти отримані дані з контрольними зразками.

Методи дослідження. культуральні, цитологічні, мікроскопічні, біофізичні (сенсibilізація поверхні трансдюсера, постановка імуноаналізу на основі поверхневого плазмонного резонансу), статистичні (математична обробка результатів дослідження).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблено методику визначення біогенних поліамінів у сироватці крові хворих на рак грудної залози за допомогою методу поверхневого плазмонного резонансу. Наукова новизна отриманих результатів захищена патентом на корисну модель №118303 «Спосіб визначення поліамінів для експресної діагностики раку грудної залози в умовах *in vitro*», який було зареєстровано 25.07.2017.

Основна особливість розробленої методики полягає у використанні нових специфічних маркерів для діагностики - поліамінів, та модифікації модифікації біосенсора специфічними антитілами, які здатні виявляти поліаміни, що робить використання даної методики орієнтованим на діагностику раку грудної залози. Виявлено прямопропорційну залежність між зміною концентрації поліамінів у зразках сироватки крові хворих на рак грудної залози і зміною резонансного кута біосенсора на основі явища поверхневого плазмонного резонансу. Оберненопропорційну залежність виявлено при визначенні поліамінів за допомогою біосенсора на основі фотолюмінесценції наночастинок оксиду цинку. Порівняно ефективність визначення поліамінів біосенсорами на основі явища поверхневого плазмонного резонансу та фотолюмінесценції на основі наночастинок оксиду цинку.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено методику визначення поліамінів у сироватці крові хворих на рак грудної залози з використанням біосенсора на основі явища поверхневого плазмонного резонансу. Розроблений метод дозволяє у досить короткі терміни (до 15 хв) визначати наноконцентрації поліамінів у сироватці крові хворих на рак грудної залози та повторно використовувати компоненти біосенсора при повторному аналізі. Скорочення часу дозволить здешевити методику, а визначення поліамінів у малих концентраціях допоможе покращити діагностику хвороби на ранніх стадіях. Окрім того, розроблений метод дозволяє досліджувати динаміку розвитку онкологічного захворювання за допомогою визначення концентрації поліамінів в режимі реального часу. На основі результатів дисертаційної роботи розроблено патент на корисну модель та зареєстровано технологію. Результати досліджень впроваджені у роботу клініко-діагностичної лабораторії «Альфа-лабсервіс» (м. Харків) та навчальний процес та наукову роботу на кафедрі лабораторної діагностики біологічних систем факультету природничих наук Національного університету «Києво-Могилянська академія» (м. Київ). Розроблена методика

може використовуватися онкодіагностичними лабораторіями, науково-дослідними інститутами та лікарнями для діагностики пацієнтів на рак грудної залози.

Особистий внесок здобувача. Відповідно до мети та завдань досліджень здобувачем самостійно проведено аналіз джерел наукової літератури з напрямку досліджень вітчизняних та закордонних авторів; розроблено схему досліджень, безпосередньо проведено експериментальні дослідження щодо модифікації поверхні трансдюсера та оптимізації методики постановки імуноаналізу для визначення поліамінів на основі поверхневого плазмонного резонансу. Спільно з науковим керівником сформульовано тему дисертаційної роботи, мету та завдання дослідження, сформульовано висновки. З наукових праць, опублікованих у співавторстві, в дисертації використано лише ідеї та положення, які є результатом особистої роботи здобувача.

Під керівництвом наукового керівника сформульовано тему дисертаційної роботи, мету та завдання дослідження, сплановано експериментальні дослідження, проведено аналіз та узагальнення одержаних результатів, а також сформульовано висновки.

З наукових праць, опублікованих у співавторстві, в дисертації використано лише ті ідеї та положення, які є результатом особистої роботи здобувача.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на 3-й міжнародній науково-практичній конференції «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології» (Київ, 2015), Науково-практичній конференції «Біотехнологія: звершення та надії (Київ, 2015), 7-й Міжнародній науково-технічній конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, 2016), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Профілактика неінфекційних захворювань: фокус на коморбідність»

(Харків, 2017), Міжнародній науково-практичній конференції “International scientific conference on medicine” (Рига, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 12 наукових праць, з них 6 статей, 4 з яких у фахових наукових виданнях України включених до міжнародних наукометричних баз даних (1 з них індексується наукометричною базою Scopus), 1 стаття у фахових наукових виданнях України, 1 стаття у фахових іноземних виданнях, 5 тез науково-практичних конференцій, патент України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота включає анотації, вступ, огляд літератури, опис напрямів дослідження, матеріали і методи виконання роботи, розділи результатів експериментальних досліджень, їх узагальнення та аналіз, список використаних джерел та додатки. Матеріал викладено на 132 сторінках друкованого тексту. Робота містить 27 рисунків і 4 таблиці.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Основні характеристики, особливості розвитку та фактори ризику РГЗ

Молочна залоза складається з півтора-двох десятків часточок залозистої тканини, що оточені жировою клітковиною й капсулою. Від капсули й до фасції великого грудного м'яза розташовані зв'язки Купера, що підтримують залозу. Кожна така частка уявляє собою альвеоларно-трубчасту залозу, яка складається з густої сітки молочних протоків, що оточені численними альвеолами. Вивідні протоки розташовані у радіальному напрямку. Кровопостачання грудної залози забезпечено гілками зовнішньої грудної, внутрішньої грудної й міжреберних артерій. Іннервацію грудної залози забезпечено 3 – 4 міжреберними нервами. Регіонарними лімфовузлами є пахвові, підключичні, внутрішньомамарні, надключичні й парастернальні [2-3].

Рак є однією із провідних причин летальності у сучасному світі. Летальність від раку можна знизити, якщо розпочати діагностувати й лікувати на ранніх етапах. Отже, прогностичні біомаркери, що зареєстровані в процесі трансформації клітин, можуть бути потенційними діагностичними засобами. В якості таких прогностичних маркерів дуже перспективно виглядають поліаміни, такі як спермін і спермідин. Найпоширенішим серед усіх видів раку сьогодні є рак грудної залози, особливо він розповсюджений у жінок старшого й похилого віку. Це зумовлює актуальність розроблення нових й удосконалення наявних методів діагностування зазначеної патології. Надзвичайна складність канцерогенезу й труднощі ранньої діагностики захворювання ставлять першорядне завдання – вибір оптимального варіанта лікування. Рак грудної залози – системне захворювання, яке передовсім пов'язане з дисфункцією імунної системи людини. Ріст пухлини переважно зумовлюється системними порушеннями клітинного й гуморального імунітету з превалюванням таких процесів, як: активація клітин-

супресорів, підвищення рівня інгібуючих процесів у крові, пригнічування ендокринної функції тимуса, посилення глюкокортикоїдної функції коркової речовини надниркових залоз [15].

Рак грудної залози (РГЗ) є досить складним і поширеним захворюванням. Рівень захворюваності на РГЗ збільшується майже скрізь у світі та складає понад 20% від нових випадків усіх видів раку, що діагностують у жінок. Слід відмітити, що він поширений нерівномірно серед різних країн. Так в розвинутих країнах Західної Європи, а також в США він посідає друге місце у загальній структурі захворювань серед жінок. У той же час в Африці та Азії це захворювання зустрічається порівняно рідко. В Україні РГЗ реєструють у приблизно 15 тис. жінок щороку; в Сполучних Штатах Америки ризик захворювання РГЗ має майже 10% жінок. І хоча рівень захворюваності в Україні досі менший у порівнянні з країнами Західної Європи і США, аналіз епідеміологічної ситуації чітко свідчить на користь того, що зазначена тенденція відповідає європейським і американським трендам. Тривожним є те, що співвідношення між хворими та померлими, в нашій країні є гіршим, аніж в розвинених країнах. Це свідчить про недостатню ефективність методів діагностики та лікування. Зрозуміло, що подібна епідеміологічна ситуація дає поштовх особливому зацікавленню цією патологією багатьох фахівців, як в галузі біології, так і медицини [3].

Також, необхідно враховувати деякі фактори психологічного характеру, що сприяють специфічному ставленню людей до зазначеної патології. РГЗ — не лише небезпечно для життя (разом з іншими онкологічними захворюваннями), існує реальна можливість втрати грудної залози, оскільки хірургічний метод його лікування і тепер залишається на першому місці. Крім того, РГЗ має також низку медичних особливостей. По-перше, це зовнішня його локалізація і тому він має виявлятися на ранніх стадіях. Проте, на жаль, в нашій країні діагноз РГЗ встановлюють

на IV стадії у 8% випадків, на III – близько 20%, а на I і II стадіях, коли є найвищі шанси на одужання, – у 70% хворих. Це зумовлює те, що кількість уперше виявлених хворих, які проживають менше року, становить близько 14%. Вважається, що РГЗ належить до гормонозумовлених, гормонозалежних і у ряді випадків до гормоночутливих пухлин [1].

Рак грудної залози займає перше місце у загальній структурі злоякісних пухлин у жінок. Захворюваність коливається від 50-60 випадків на 100000 жіночого населення (Великобританія, Данія, США, Канада, Нідерланди, Україна) до 2-5 (Мексика, Японія). В структурі онкологічних захворювань в Україні РМЗ посідає перше місце. Найбільший показник летальності на 100000 населення є у Великобританії – 36,0, на Мальті він становить 35,5, у Данії – 34,5. Натомість найнижча смертність фіксується в Перу – 5,6, в Японії – 6,7, у Еквадорі – 6,5 на 100000 населення [4].

В Україні на протязі десяти останніх років рак грудної залози залишається медико-біологічною і соціально-економічною проблемою охорони здоров'я України, актуальність якої зростає в зв'язку з радіаційним забрудненням великих територій України внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС. Щороку в Україні реєструють понад 16 тисяч нових випадків РГЗ, з них 24,5% становлять жінки в репродуктивному віці. Кожного року помирає понад 7,8 тисяч жінок, з яких понад 20% – у репродуктивному віці. Рівень захворюваності на РМЗ протягом останніх 30 років зріс у 2,5 рази, щороку приріст цього показника складає близько 7,1%. Максимальних значень рівень захворюваності на рак грудної залози набуває у віці 55-59 та 70-74 років. Кожна третя жінка, у якої виявлено рак грудної залози, помирає протягом року після встановлення діагнозу. Кожного року в світі від раку грудної залози вмирає 41 тисяча жінок. Захворюваність на рак грудної залози має стабільний приріст у всіх вікових групах жіночої популяції України. Щорічно реєструється понад 17,7 тисяч нових випадків хвороби, а на облік онкологічних установ

перебувають 163,3 тисяч хворих. Протягом останніх 25 років рак грудної залози займає перше місце в структурі онкологічної захворюваності жінок України. За уточненими даними Національного канцер реєстру, в 2013 році питома вага цієї патології склала 22,2% [4].

За останніми даними отриманими з канцер реєстру України за останні роки рак грудної залози значно «помолодшав». При вивченні вікових особливостей захворюваності на рак встановлено, що вже у віковій групі 18-29 років злоякісні новоутворення грудної залози потрапляють в п'ятірку найбільш поширених нозологічних форм раку, в наступних вікових групах (30-74 року) знаходяться на першому місці, а після 75 років - на другому [32; 33]. Найбільш частою формою РГЗ є рак протоків грудної залози, або так званий протоковий (дуктальний) рак. Ця злоякісна пухлина, що виникає у долях грудної залози, має назву долькового, або лобулярного, раку. Досить рідко спостерігаються форми РГЗ, які симулюють запалення – бешихоподібний та маститоподібний. При цьому спостерігаються класичні симптоми запалення грудної залози — збільшення температури органу й тіла, почервоніння, набряки [7].

Захворіти на рак грудної залози може будь-яка жінка, проте в одних ризик виникнення пухлини менший, а в інших – більший. Не позбавлені від цього ризику й чоловіки, проте понад 99% усіх пацієнтів з РГЗ є жінками. До групи високого ризику відносять насамперед осіб з поєднанням певних фенотипічних та генетичних факторів, найперше – це специфіка стилю життя. Деякі з факторів, що збільшують ризик захворювання на РГЗ, наступні: вік (понад 40 років); спадкова схильність (жінки, в анамнезі у яких матері чи сестри хворіли на РГЗ, мають значно більші шанси захворіти цією хворобою); пізня менопауза; ранній початок менструацій (до дванадцяти років); пізнє народження першої дитини (у віці більше 30 років; переривання вагітності; у жінок, що ніколи не народжували дітей; фіброзно-кістозна мастопатія, а також інші

проліферативні захворювання молочних залоз; надмірна вага (понад 40% від норми); цукровий діабет, артеріальна гіпертензія, надмірне вживання алкоголю та паління. Підвищує ризик розвитку РГЗ і розвиток раку яєчників та ендометрію в анамнезі, що також має зв'язок з гормональною активністю. Збільшений ризик захворюваності на РГЗ мають жінки, чий родичі першого ступеню споріднення хворіли на РГЗ (мати, сестра, донька) [6]. Важливу роль у виникненні РГЗ відіграють мутації у генах BRCA1 або BRCA2. Для виявлення зазначених мутацій роблять скринінгові тести, проте вони не рекомендовані для проведення всім жінкам, вони використовуються у необхідних випадках після генетичного консультування. Спеціалісти відзначають, що РГЗ, викликаний зазначеними мутаціями, складає від 2 до 10% випадків захворювання. Нині є очевидним, що гормональний аспект в етіології РГЗ найбільш обґрунтований, і це вказує на те, що естрогени виступають початковим стимулом для клітинної проліферації молочної залози. Одночасний вплив прогестерону підвищує ступінь цієї проліферації. Такий висновок ґрунтується, у значній мірі, на тому, що виникнення мітотичних піків клітинної діяльності відбувається саме в лютеальній фазі менструального циклу. Користування оральними контрацептивами або гормональною замісною терапією, особливо при тривалому застосуванні, вірогідно збільшує ризик розвитку РГЗ у жінок [16; 76].

Підвищений ризик розвитку РГЗ мають також жінки, в яких фіксувалися менархе у віці до 12 років, або клімакс у віці понад 55 років, з тієї причини, що залозиста тканина їх молочних залоз зазнає впливу естрогенів більш тривалий час. Причиною розвитку РГЗ можуть також бути пізні пологи або відсутність вагітності. Захворіти на РГЗ можуть й жінки, в яких перша вагітність була у віці понад 30 років, або ж доношеної вагітності взагалі не було. Вагітність, вірогідно, має захисну дію проти розвитку РГЗ, позаяк вона сприяє переходу клітин залоз на завершальну

стадію дозрівання. Дослідження свідчать про те, що, як і за інших локалізацій раку, різні звички, вірогідно, сприяють розвитку РГЗ. Подібні фактори включають надмірну вагу (за останніми даними такі жінки мають більший ризик розвитку РГЗ; недостатня фізична активність (фізична активність зменшує рівень гормонів й активізує імунну систему. Також низька фізична активність часто викликає ожиріння); вживання алкоголю (вживання понад однієї дози алкогольного напою на день, вірогідно, збільшує ризики розвитку РГЗ). Також ризик розвитку РГЗ збільшується за наявності впливу високих доз опромінення. Ще одним фактором ризику розвитку РГЗ є атипова гіперплазія (облігатний передрак, характерним для якого є патологічна, проте не злоякісна картина) клітин доброякісних пухлин в області грудної залози. Це може бути, наприклад, вузлово-фіброзно-кістозна мастопатія, фіброаденома, дифузна мастопатія, ліпогранульома грудної залози або її кіста. Причиною розвитку цих доброякісних пухлин є дисгормональна гіперплазія тканини грудної залози [7].

Рак грудної залози розглядають як результат накопичення генетичних пошкоджень у нормальних клітинах протягом багатьох років. Зазначені зміни індукують і внутрішні, і зовнішні фактори. Провідне значення в етіології спорадичного раку грудної залози має порушення функції гіпоталамо-гіпофізарно-яєчникової системи, що проявляється у вигляді коливань рівнів факторів росту й гормонів (естрогенів, прогестинів, трийодтироніну, дигідроандростерону, тироксину, лютеїнізуючого гормону, β-хоріонічного гонадотропіну) [25].

Спорадичний рак грудної залози становить близько 91% від усіх раків грудної залози. Іншою причиною пухлинного росту є зміни концентрації й активності цитоплазматичних рецепторів до них. Генетично зумовлений РГЗ (за рахунок мутацій генів BRCA-1 та BRCA-2) становить близько 9%. Шкідливими факторами зовнішнього середовища є місце

проживання, надмірне іонізуюче випромінювання, електромагнітні поля, зловживання спиртними напоями, неправильне харчування, тютюнопаління і травми [27].

Розглядають два рівні канцерогенезу раку: на рівні органу та на рівні клітини. Канцерогенез на рівні клітини характеризується змінами фенотипу епітелію молочних залоз під впливом ендокринних факторів. Канцерогенез на рівні органу характеризується змінами, що викликають утворення дифузних та локалізованих гіперплазій молочних залоз (фіброаденоматоз, мастопатії). В результаті впливу тих або інших факторів канцерогенезу з'являється пошкодження нормальних клітин грудної залози (найчастіше в протоковому епітелії, рідше – в альвеолах). Як відповідь на це виникають відновні процеси, що супроводжуються проліферативними змінами. Під час проліферації з'являються мутації залозистих клітин, унаслідок чого деякі клітини набувають характеристики пухлин.

Клітина вважається злоякісною відтоді, коли унаслідок мутацій вона набуває здатності до інвазивного зростання. Після досягнення діаметру пухлини близько 1/2 мм (103 клітини) розпочинається процес неоангіогенезу. Така пухлина інвазує судини, які проростають в неї. У судинне русло потрапляють клітини пухлини, відбувається інтравазація. Ракова пухлина грудної залози протягом доби виділяє у кровоносне русло до 1 млн. злоякісних клітин. Близько 99,9% таких клітин гине. Проте окремі клітини з током крові чи лімфи потрапляють до судин паренхіматозних (або інших) органів чи лімфовузлів. Там вони імплантуються, руйнують інтиму судин й виходять за межі судини, відбувається екстравазація. Органами, в які найбільш часто метастазує РГЗ, є печінка, легені, головний мозок, кістки, контралатеральні лімфатичні вузли. Дещо рідше він метастазує у контралатеральну молочну залозу, наднирники. Як засвідчили дослідження, метастази у лімфатичні вузли й віддалені метастази розвиваються одночасно. Маніфестація

метастатичного ураження лімфовузлів відбувається, як правило, раніше, аніж маніфестація віддалених метастазів [25].

1.2. Діагностика раку грудної залози

1.2.1. Діагностичні маркери раку грудної залози. Останнім часом спостерігається різке збільшення онкологічної захворюваності як в світі, так і в Україні. Проблема своєчасного виявлення раку грудної залози полягає не лише в його безсимптомному розвитку, але і у відсутності надійних маркерів, які сприяють ранньому виявленню неопластичного процесу. За статистикою, 80% хворих самі випадково виявляють пухлину, яка у половині випадків знаходиться на стадії метастазування. У більшості хворих пухлину виявляють на індивідуальних профілактичних оглядах лікарі різних спеціальностей, значно менше - при проведенні масових професіональних оглядів [30]. На жаль, невеликі пухлини до 2 см і розташовані глибоко в тканині грудної залози практично не піддаються клінічній діагностиці.

Протягом 10 останніх років науковці в галузі імунології та імунотерапії здобули значних успіхів у дослідженні РГЗ. Так, для діагностики різних його видів широко використовують методи, які базуються на детекції біомаркерів – молекул, специфічних до певних типів клітин. Наразі такими методами є метод імуноферментного аналізу (ІФА), де відбувається виявлення специфічних антитіл та ферментних міток та полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) у режимі реального часу для вияву нуклеотидних послідовностей генів, що кодують той або інший специфічний для цього захворювання білок [21].

Для ранньої діагностики застосовують методи оцінки ефективності лікування злоякісних пухлин, виявлення метастазування, визначення речовин, рівень яких так або інакше пов'язаний з наявністю у хворого онкологічного захворювання - так званих пухлинних маркерів [17; 24].

Досвід використання таких методів показав, що впровадження їх в медичну практику суттєво підвищує її ефективність. Онкологічні маркери – продукти метаболізму неопластичних клітин, що можуть бути специфічними для пухлини одного типу і з'являтися при наявності онкологічного захворювання. У здорових людей ці сполуки як правило відсутні або визначаються в незначних кількостях [37]. Аномальна експресія геному, яка спостерігається в пухлинних клітинах, може призводити до порушень основних процесів – таких, як диференціація і проліферація. У таких клітинах відбувається і зміна метаболізму, яка супроводжується продукцією певних сполук [17]. Від сполук, які продукуються нормальними клітинами, вони відрізняються якісно або кількісно. Всі маркери поділяються на: маркери, що продукуються й секретуються у біологічних рідинах організму саме пухлинними клітинами (пухлиноасоційовані маркери) та маркери, продукція й секреція яких є результатом метаболічних порушень під час онкологічного захворювання. Вони можуть бути специфічними (пухлинно-асоційовані маркери) і неспецифічними; маркери, які з'являються в разі виникнення гормонозалежних пухлин, містяться на цитоплазматичній мембрані клітини пухлини і виконують рецепторну функцію [19].

Рівень пухлинних маркерів має залежність від ряду факторів. Зокрема від властивостей пухлини, лікування та біохімічних особливостей самого маркеру. У хворих з неонкологічною патологією рівень маркерів, як правило, не перевищує нормальних значень [29]. Але необхідно враховувати можливість неспецифічного підвищення їх рівня. Зокрема він може підвищуватися при деяких патологічних процесах – таких, як запальні захворювання печінки, підшлункової залози, легень і так далі. У сучасній онкологічній практиці дослідження пухлинних маркерів проводять з метою скринінгу онкологічної патології, оцінки поширеності процесу (як

допоміжний критерій), діагностики рецидивів і метастазів і оцінки ефективності лікування [20].

У сучасній онкологічній практиці дослідження пухлинних маркерів проводять для скринінгу онкологічної патології, оцінювання поширеності процесу (у якості допоміжного критерію), діагностики рецидивів та метастазів і оцінки ефективності лікування [36].

1.2.2. Поліаміни в якості пухлинних маркерів. Більшість видів раку грудної залози легко діагностувати за допомогою мікроскопічного аналізу біопсії. У той час як методи скринінгу є корисними при ранній діагностиці раку, подальше тестування є необхідним, щоб визначити стадію захворювання. Зараз застосовується цілий ряд скринінгових тестів, в тому числі клінічних, а також мамографії. Проте, жінки не хочуть проходити дані види тестування через сором'язливість, витрати часу та чималу вартість. Відтак, пошук нового простого, зручного й дешевого способу скринінгу, дуже необхідний. Є багато різних пухлинних маркерів, які вказують на конкретний процес захворювання, і вони використовуються в онкології, щоб допомогти виявити наявність раку. Концентрація пухлинних маркерів, таких як PEA та CA15-3, значно збільшується у пацієнтів з раком грудної залози [68].

Проте підвищений рівень пухлинних маркерів також може бути викликаним іншими причинами. Ці маркери є високомолекулярними сполуками, такими як глікопротеїни і ферменти.

Одним з перспективних напрямків діагностики РГЗ на ранніх стадіях є пошук пухлинних маркерів, які б з високою достовірністю дозволяли виявляти виникнення пухлинного процесу ще задовго до появи клінічних проявів, особливо у пацієнтів із груп ризику [27]. Одним з таких перспективних маркерів є поліаміни [19].

Поліаміни - путресцин, спермідин та спермін являють собою низькомолекулярні основи, які необхідні для нормального росту та

диференціації клітин. Ні клітини у культурі, які вичерпали запас поліамінів, ні мутантні клітини ссавців, які не мають ферментів біосинтезу поліамінів, не здатні до реплікації. Поліаміни позитивно заряджені при нормальному внутрішньоклітинному рН завдяки протонізації їх амінових груп, а катіони, що утворюються, нейтралізують заряди на внутрішньоклітинних поліаніонах нуклеїнових кислот і компонентах мембрани. Унікальна стереоспецифічна форма спермідину та сперміну дозволяє взаємодіяти зі спіральною структурою нуклеїнових кислот, що призводить до більш ефективної реплікації та транскрипції. Ракові клітини, вирощені в культурі, трансплантовані пухлини тварин, пухлини головного мозку, шкіри, передміхурової та грудної залози містять більш високі рівні поліамінів та поліамінових біосинтезуючих ферментів, ніж звичайні тканини. За попередніми даними було продемонстровано, що рак грудної залози спричиняє більш високий рівень путресцину, спермідину та сперміну у хворих, ніж відповідна нормальна тканина [58].

Поліаміни пов'язані з різними біологічними процесами [39; 65]. Це активні біогенні аміни, які беруть участь у низці основних клітинних функцій – зростанні клітин, проліферації та диференціюванні, а також клітинних механізмів, які регулюють відповідь клітин на подразники. Путресцин, спермідин та спермін мають протизапальні й антиоксидантні властивості, а відтак можуть бути залучені до захисту клітин організму при захворюванні та старінні [67; 79].

Таким чином, показано, що поліаміни збільшують тривалість життя. Проте при високих концентраціях поліаміни також можуть чинити токсичний вплив на клітини та сприяти загибелі клітин, головним чином через окислювальні механізми. У зв'язку з цим поліаміни виступають важливими клінічними й біохімічними маркерами для злоякісних новоутворень. Вперше це було показано у сечі пацієнтів, хворих на рак, де поліаміни мали більшу присутність, аніж у здорових пацієнтів [79].

Поліаміни, таким чином, є одними з важливих біохімічних пухлинних маркерів.

1.2.3. Структура та властивості поліамінів. Поліаміни пов'язані з різними біологічними процесами [52]. Ці активні біогенні аміни беруть участь в ряді основних клітинних функцій, в тому числі рості клітин, проліферації і диференціюванні, а також регуляції клітинних механізмів стрес-відповідь і виживання. Спермідин і спермін володіють протизапальними, а також антиоксидантними властивостями, і, таким чином, були залучені в клітинний і організменний захист при процесах старіння і хворобах [60].

За отриманими даними рівень основних біогенних поліамінів у здорових людей знаходиться на рівні наномолярних концентрацій (в середньому 4-5 нМ). Так концентрація сперміну в крові здорових чоловіків складає $5,40 \pm 1,23$ нМ/мл, у жінок $7,07 \pm 1,03$ нМ/мл, а спермідину – $7,54 \pm 1,32$ нМ/мл у чоловіків і $9,95 \pm 1,11$ нМ/мл. Відповідно. Також, за останніми даними концентрацію поліамінів також визначали в слині. Так у здорових людей рівень сперміну та сперміну в слині складає 0,5 нМ/мл, і також може використовуватися як діагностичний показник [5].

1.3. Сучасні методи аналізу поліамінів

Аналіз поліамінів виконують за допомогою наступних сучасних методів: тонкошарова рідинна хроматографія, електрофорез, імунохімічні методи, ферментативні методи, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) і газова хроматографія (ГХ) [18; 41]. Труднощі, які відчувають при спробі визначити і виміряти кількість поліамінів в біологічних зразках, випливають з трьох характеристик: їх розміру, оскільки вони є низкомолекулярними аліфатичними амінами, містяться в низькій концентрації, і здатні за допомогою реактивних центрів - аміногруп адсорбуватися на твердих поверхнях. Таким чином, методи аналізу поліамінів повинні включати процедури вилучення, і, можливо, очищення,

щоб відокремити їх як від інших аміновмісних сполук (наприклад амінокислот), так і один від одного, щоб отримати від них в кольорові або флуоресціюючі сигнали для ідентифікації, а потім зробити кількісні вимірювання. Всі доступні методи мають певні обмеження і до сьогодні не існує простої, точної методики для кількісного визначення різних поліамінів [71].

Сучасним трендом в розвитку діагностики раку грудної залози є розробка неінвазивних діагностичних процедур. До їх числа відносяться різні інструментальні методи (мамографія, ультразвукова діагностика, магнітно-резонансна томографія). Сучасне діагностичне використання методів молекулярного аналізу теж орієнтовано, і зокрема на неінвазивний підхід, а саме на аналіз біологічних рідин, і, в першу чергу, циркулюючої крові. Дійсно, такий аналіз не вимагає матеріалу, отриманого безпосередньо з пухлинної тканини, а значить, не залежить від локалізації пухлини, маючи на меті раннє виявлення первинних пухлин або вторинних осередків, а тому надто затребуваний сучасною наукою [29].

Перспективними в цьому напрямку є біосенсори, які можуть забезпечити можливість аналізу клінічних зразків у домашніх умовах або при екстреній діагностиці в лікарні. Перспективним серед них виглядає біосенсор на основі феномену поверхневого плазмонного резонансу (ППР). Його феномен полягає в тому, що поляризований лазерний промінь входить в середовище з великим рефракторним індексом і вище критичного кута відбувається його повне внутрішнє відбиття. При цих умовах електромагнітне поле світлового променя проникає через тонкий шар золота, що покриває скляну пластинку. При певному куті падіння світлового променя відбувається взаємодія цих коливань з вільними електронами (плазмонами) на поверхні золотої плівки. Як результат такої взаємодії виникає збудження поверхневих плазмонів, що призводить до зменшення інтенсивності відбитого променя [34]. Це і є феномен ППР, а

кут, при якому настає плазмонний резонанс, називається резонансним. Величина останнього залежить від рефракторного індексу і діелектричної постійної середовища, яка контактує з металом і знаходиться на відстані близько 1 мкм від поверхні. Вона також чутлива до змін стану поверхні, які викликані появою на ній додаткових шарів внаслідок іммобілізації біологічного матеріалу і виникнення з ним специфічних взаємодій. Для кращої детекції біологічних агентів можна використовувати покриття золотої плівки додатковим шаром моноклональних чи поліклональних антитіл [10].

Антитіла (моноклональні та поліклональні) застосовуються при лікуванні раку як терапевтичні засоби спрямовані на лікування та діагностику орієнтовану на ракові клітини та їх біомаркери [54]. Поліклональні антитіла можуть бути синтезовані проти будь-яких біомаркерів або клітин, і, з впровадженням високоточних методик, застосування цих молекул в біосенсорах було успішним [52]. Проте використання моноклональних антитіл є більш результативним. В даний час існує низка антитіл для специфічних маркерів раку. Проте відсутність стійкості молекули антитіла робить цей підхід непридатним для тривалого зберігання пристрою та перешкоджає більш широкому застосуванню та комерціалізації. Тому заміна природних біомолекул штучними рецепторами чи замінниками стала привабливою галуззю досліджень в останні роки [66].

Переваги використання антитіл полягають у тому, що вони міцні, стабільніші та недорогі для виробництва, оскільки вони можуть бути виготовлені за допомогою методів органічної та неорганічної хімії та можуть бути легко модифіковані для кращої іммобілізації на поверхні сенсора. Вони також унеможливають використання тварин у виробництві афінних рецепторів, як у випадку з поліклональними антитілами [38].

Отже, пошук нового простого, зручного та дешевого способу скринінгу є дуже потрібним. Існує багато різних пухлинних маркерів, які вказують на конкретний злоякісний процес. Саме їх використовують в онкології, аби допомогти визначити наявність раку. Концентрація пухлинних маркерів, як от раковий ембріональний антиген (РЕА) та раковий антиген СА15-3, суттєво зросла у пацієнтів з РГЗ. Проте підвищення рівня пухлинних маркерів також може бути викликане іншими чинниками. Ці маркери можуть бути макромолекулярними сполуками, як от ферменти та глікопротеїни. Поліаміни натомість є низькомолекулярними сполуками, які можуть бути пов'язані з підвищенням проліферативної активності клітин пухлини, про що свідчить підвищення біосинтезу та накопичення поліамінів. Тож, концентрація поліамінів, як от спермін і спермідин чи путресцин, збільшується в плазмі крові та сечі [86]. Тому зміни вмісту поліамінів можуть бути важливими біохімічними ознаками пухлини.

1.3. Біологічні сенсори: класифікація та застосування

1.3.1. Загальна характеристика біосенсорів та їх різновиди.

Біологічні сенсори – це аналітичні прилади, до складу яких включено фізичний чутливий елемент, що перебуває в тісному контакті з біологічним матеріалом і перетворює фізико-хімічний сигнал, генерований цим матеріалом під час взаємодії з досліджуваною речовиною, на електричний [59; 83]. Останній фіксується, підсилюється та обробляється за допомогою комп'ютера. При цьому величина електричного сигналу пропорційна концентрації речовини, яку визначають. Основні принципи дії імунобіосенсорів базуються на визначенні специфічної взаємодії антиген – антитіло [60]. Було запропоновано багато різних типів біосенсорів, які відрізняються між собою за трансдюсером і біологічним матеріалом і здатні визначати різні біологічні речовини – від низькомолекулярних сполук до нуклеїнових кислот. На жаль, незважаючи на значний розвиток

цієї галузі науки, більшість запропонованих біосенсорів все ще залишаються складними, багатостадійними та вимагають для аналізів дорогих реактивів [91].

У залежності від біологічних структур, які використовують у біосенсорних системах, останні можуть бути поділені на каталітично активні (ферментні) та ті, що засновані на афінних взаємодіях (на основі антитіл та рецепторів). На відміну від ензимосенсорів, за допомогою яких безпосередньо визначають продукт ферментативної реакції, імуно- або біоафінні сенсори реєструють специфічне зв'язування біомолекул. У разі використання ферментів для посилення чутливості реєстрації імунного комплексу біосенсори називають імуноензимними. Залежно від типу трансдюсера імунні біосенсори поділяють на електрохімічні, механічні, калориметричні, магнітні та оптичні. [98]. До електрохімічних належать потенціометричні, амперометричні, кондуктометричні та ємнісні біосенсори [12].

Потенціометричні біосенсори реєструють зміни потенціалу електрода з біомембраною, які відбуваються у процесі її взаємодії з відповідною досліджуваною речовиною [28].

Амперометричні біосенсори вимірюють струм, що виникає під час окислення-відновлення електроактивних речовин на електроді, на який нанесено біоматрицю. Вони належать до ензимного або імуноензимного типу [8]. За допомогою кондуктометричних біосенсорів вимірюють зміни провідності між парою електродів через електроліт. Ці зміни відбуваються внаслідок біохімічної реакції, яка супроводжується споживанням або продукуванням електроліту [9].

Під час роботи ємнісних біосенсорів реєструються зміни ємності системи, що відбуваються у процесі взаємодії біомолекул. У механічних біосенсорах використовують п'єзоелектричні матеріали, які здатні до коливань у полі електричного струму. Взаємодія певної молекули з її

молекулою-мішенню на кристалі спричинює зміну поверхневої маси, що викликає зміщення резонансної частоти його коливань [46; 47]. У біосенсорах, розроблених на основі ефекту звукових коливань, також використовують п'єзоелектричні кристали, але в комбінації з акустичними хвилями. Взаємодія між молекулами на акустичній поверхні зумовлює зміну швидкості поширення звукової хвилі [75]

Загальний принцип роботи калориметричних біосенсорів полягає у вимірюванні тепла, що виділяється внаслідок реакції між ферментом і субстратом [31; 35]. Магнітними біосенсорами визначають зміни магнітної проникності, що виникають, якщо один з імунокомпонентів помічено феромагнітною міткою [13]. В оптичних біосенсорах специфічна взаємодія реєструється за допомогою елементів, чутливих до змін інтенсивності фотолюмінесценції, флуоресценції, хемілюмінесценції, поглинання та розсіювання світла [14]. Нині вже запропоновано багато підходів, в яких використано різні оптичні ефекти для розробки імунобіосенсорів, що базуються на оптичних волокнах та інтегральній оптиці, затухаючій електромагнітній хвилі, безвипромінювальному перенесенню енергії і поверхневому плазмонному резонансі. Серед оптичних імунобіосенсорів є й такі, які базуються на “непрямій” та “прямий” реєстрації взаємодії між молекулами [34]. До альтернативних методів аналізу належить проточний імуноаналіз.

1.3.2. Способи функціоналізації поверхні біосенсорів. Вибір способу функціоналізації поверхні перетворювача залежить від природи використовуваних компонентів і завдань, на вирішення яких буде спрямований розроблюваний біосенсор. Перетворювачі, у яких поверхні представлені золотими або срібними плівками, часто модифікують тіолами, що формують самозбірними моношарами (СЗМ). Як правило, використовують довголанцюгові алкілтіоли з гідроксильними групами. Останні реагують з епіхлоргідрином, який має епоксигрупи в якості

електрофільних сайтів зв'язування. Знаходять застосування і карбоксиалкіл-тіоли [12]. Оксидні поверхні (кварц, оксиди металів) можуть бути досить легко модифіковані сіланами

До найбільш часто вживаних силанів відносяться аміноалкільні і епоксидалкільні похідні. У порівнянні з СЗМ, що формуються на золотих або срібних плівках, сіланізація поверхні застосовується рідше. Нерегульованої олигомеризації, яка часто супроводжує процес сіланізації можна уникнути, застосовуючи моно-алкоксисілани або методи підготовки, які гарантують присутність обмеженої кількості води [38].

Найбільш широко використовуваний полімер для модифікації поверхонь біосенсорів - полісахарид декстран, модифікований бромцтовою кислотою до карбоксиметил-декстрану. Також було опубліковано дані про формування аміно-функціоналізованих полімерів, що включають декстран, поліоксиетилен і хітозан. Декстранові плівки являють собою гнучкі, подібні до гідрогелю шари, які зшиті між собою, і дозволяють провести аналіз в об'ємній площині, а не на плоскій поверхні, забезпечуючи при цьому значно більш високу кількість специфічних сайтів зв'язування на поверхні. Іонообмінні властивості шару декстрану сприяють концентрації білків при їх іммобілізації [45].

Нещодавно, був розроблений спосіб отримання аміно-поліоксиетиленової поверхні з надзвичайно низьким рівнем неспецифічного зв'язування. Така поверхня являє собою двовимірну структуру, в якій всі сайти зв'язування мають однакову доступність, що виключає можливість відмінностей в кінетиці зв'язування окремими сайтами. Подвійний шар може бути сформований за допомогою плівок Ленгмюр-Блоджетт або при розподілі везикул по гідрофільним поверхням.

У цих способах досягається дуже важлива перевага - орієнтована іммобілізація ліганду. Ще один спосіб іммобілізації біологічного матеріалу полягає в його адсорбції на гідрофобних поверхнях, отриманих за

допомогою алкілтіолів і алкілсіланів, до яких можуть бути приєднані моношари ліпідів, що формують гібридну двошарову мембрану [54]. Досить цікавий підхід реалізований при використанні подвійних шарів ліпідів для іммобілізації мембранних білків. Він дозволяє проведення досліджень на мембранних структурах [37].

Іммобілізація лігандів на поверхні надзвичайно важлива для успішної розробки біосенсорного аналізу. Метод зв'язування повинен бути ефективним, забезпечувати стабільну асоціацію (щоб запобігти варіювання сигналу) і дозволяти контролювати кількість іммобілізованого рецептора. Амінний зв'язок (наприклад, із залишками лізину або з N- термінальними залишками на білковому рецепторі) дозволить утворити гетерогенну сукупність рецепторів з випадковою орієнтацією на поверхні. Однак, якщо іммобілізація проходить при низькому рН, кінцевий амін ймовірно може бути набагато більш хімічно активним, ніж γ -аміногрупа будь-яких залишків лізину, тоді зв'язування буде ефективним. Біологічні молекули з низьким значенням ізоелектричної точки ($pH < 3.5$) важко закріпити аміним зв'язком. При низькому рН, необхідному для електростатичної концентрації на поверхні біосенсора, амінні зв'язки приєднують протони до первинних аміногруп і зменшують ефективність зв'язування. Подальшу взаємодію з сульфгідрил-реактивними сполуками (наприклад, піридинілдітіоетанаміном (ПДЕА), N-гідроксисукцинімід складним ефіром) дозволяє взаємодію з вільними поверхневими тіолами (наприклад, цистеїном, метіоніном) для формування зворотного дисульфідного зв'язку. Аналогічним способом, можна сформувати стабільні тіоефірні зв'язки, використовуючи малеїмід зв'язуючі реагенти типу сульфосукцинімідил-4-(N-малеїмідометил) циклогексанкарбоксилат і N- (γ -малеїмідобутирилокси)сульфосукцинімід складний ефір [56].

Зв'язування лігандів з карбоксильними групами на поверхні зазвичай досягається шляхом активації карбоксильних груп N-

гідроксисукцинімідом і 1-етил-3- (3-диметиламінопропіл) карбодімідом. Таким же способом можуть бути закріплені ліганди, вміст аміногрупи або тіолової групи. Альтернатива полягає в активації карбоксильних груп, яка може бути індукована цистамін-дигідрохлоридом, що супроводжується редукцією дитіоеритрітола, формуванням сульфгідрильних груп, які можуть пов'язувати ліганди, що містять тіольні групи. Альдегідні групи можуть бути приєднаними до рецептора або бути сформованими помірним окисленням будь-якого присутнього цис-діола. Останні методи мають перевагу, оскільки вони забезпечують більш однорідні сукупності орієнтованих рецепторів на поверхні. Активовані карбоксильні групи також можуть реагувати з гідразин гідрохлоридом, поєднуючи альдегідні групи, що формують гідразин. Вони можуть бути стабілізовані відновленням за допомогою ціаноборгідриду натрію. Зв'язування з аміногрупами на поверхні може бути досягнуто за допомогою полімеризованого глутаральдегіда для лігандів, що містять аміногрупи, або за допомогою карбодімідів, якщо ліганд містить тільки карбоксильну групу [57]. Поверхні, модифіковані саліцилгідроксаміновою кислотою, можуть бути використані для отримання комплексів з рецепторами, активованими фенілдиборною кислотою. Різні методи іммобілізації лігандів засновані на афінному зв'язуванні, наприкладі зв'язування біотин-кон'югованого ліганду з поверхнею модифікованою авідином, стрептавідином або нейравідином, або при зв'язуванні антитіл звичайним шляхом. Стрептавідинові поверхні можуть бути отримані шляхом прямої адсорбції білка на золоту або срібну поверхню, модифікацією золота біотинілюванням тіолами або біотин-нітрофенілефіром, біотинілюванням оксидних поверхонь через метакрилоксипропілтриметоксисілан або аміносілани і біотинілюванням аміно-поліоксиетилену.

Безліч біотин - зв'язуючих сайтів стрептавідину на кожній молекулі дозволяє поперечно зшивати біотинільовані ліганди за допомогою

стрептавідину. Метод дуже ефективний і призводить до утворення досить стабільних комплексів. Такий підхід зазвичай використовують для іммобілізації 5'-біотинильованих олігонуклеотидів. Моноклональні антитіла можуть бути ковалентно приєднані до твердої підкладки через амінний зв'язок. Метал координовані групи типу імінодіоцтової кислоти і нітрилотриоцтової кислоти широко використовують для прямої іммобілізації рецепторів, які несуть 6 і 10-гістидин [53].

1.3.3. Імуносенсиори на основі поверхневого плазмонного резонансу та їх застосування. Одним з різновидів оптичних імунобіосенсорів є ті, що базуються на явищі поверхневого плазмонного резонансу (ППР). Принцип роботи цих біосенсорів полягає в тому, що чутливий матеріал, іммобілізований на поверхню трансдюсера (перетворювача), специфічно взаємодіє з молекулами, що піддаються аналізу [11].

При наявності в оточуючому середовищі молекул – аналітів (краще, коли їхня молекулярна маса більше 10 кДа) відбувається зв'язування цих молекул з чутливим шаром, що і фіксує прилад у вигляді вихідного сигналу перетворювача. Таким чином можна виявити в зразку наявність антитіл до токсинів, вірусів та бактерій, проконтролювати якість їжі чи фармацевтичної сировини [69].

Процедура іммобілізації чутливого матеріалу є суттєвим моментом для отримання достовірних результатів досліджень та ефективної роботи перетворювача біосенсора. З одного боку закріплення рецепторів на оптичних поверхнях не повинно призводити до небажаних структурних ефектів на металевій поверхні перетворювача. З іншого боку – можливість та швидкість проведення реакції, а також величина відгуку перетворювача суттєво залежать від орієнтованої іммобілізації біологічних молекул в природному, не деструктивному стані [4]

Феномен аномальної дифракції на дифракційній ґратці, який відповідає збудженню хвилі поверхневої плазми, вперше було описано Вудом на початку двадцятого сторіччя. В кінці 60-х років оптичне збудження поверхневих плазмонів було продемонстровано Кретшманом та Отто методом атенуації підсумкового відбиття. З того часу поверхневі плазмони було детально досліджено та оцінено їх головні властивості [56].

ППР – це осциляція щільного заряду, яка може виникати на поверхні розділу двох середовищ з діелектричними константами з протилежними знаками, наприклад, метал і діелектрик. Поверхневий плазмон – це особлива форма електромагнітної хвилі, що розповсюджується вздовж поверхні металу. Існування поверхневих плазмонів асоційоване з колективними осциляціями вільних електричних навантажень на поверхні металу [72]

Оптичний біосенсор на основі поверхневого плазмонного резонансу включає оптичну систему, трансдюсер, який співвідносить оптичну і біохімічну частини, та електронну систему, яка підтримує оптоелектронні компоненти біосенсора та дозволяє отримувати дані в процесі роботи. Трансдюсерний засіб трансформує зміни кількості речовини в зміни рефракторного індексу, що може бути визначено шляхом реєстрації оптичного сигналу ППР. Оптична частина біосенсора на основі ППР містить джерело оптичного випромінювання та структуру, в якій реєструється оптичний сигнал. Головні властивості біосенсора на основі ППР визначаються властивостями субсистем. Сенсорна чутливість, стабільність та оперативність залежать як від властивостей оптичної системи, так і від властивостей перетворювача. Селективність та час відгуку сенсора в основному визначаються властивостями перетворювача [22].

Таким чином, між двома середовищами з різними коефіцієнтами заломлення, або рефракторними індексами (наприклад, скляна призма та

розчин зразка), розташована тонка золота або ж срібна плівка, яка слугує в якості перетворювача оптичного біосенсора. Поляризований лазерний промінь входить в середовище з більшим рефракторним індексом (скляна призма), і вище критичного кута відбувається його повне внутрішнє відбиття. За цих умов електромагнітне поле світлового променя проникає через золоту плівку. За певного кута падіння світлового променя відбувається взаємодія електромагнітної хвилі променя з вільними електронами на поверхні золотої плівки, і це спричиняє збудження поверхневих плазмонів, в результаті чого зменшується інтенсивність відбитого променя [60].

Це, власне, і є феномен ППР, а кут, при якому настає плазмонний резонанс, позначено як резонансний кут. Величина останнього залежить від рефракторного індексу та діелектричної сталої середовища, що контактує з металом і знаходиться на відстані близько 1 мкм від його поверхні. Вона також чутлива до змін стану поверхні, що спричинені появою на ній додаткових шарів внаслідок іммобілізації біологічного матеріалу та виникнення з ним специфічних взаємодій. Описаний ефект використовується для створення ряду імунних біосенсорів, спрямованих на визначення великої кількості різних антигенів та антитіл [61]

При адсорбції та взаємодії молекул на золотій поверхні перетворювача змінюються діелектричні властивості адсорбційного шару, що призводить до трансформації резонансної кривої при адсорбції шару білку різної товщини для модельної системи, що містить скляну призму, буферний розчин та золоту плівку.

Відомо, що поверхневий плазмонний резонанс може бути зареєстрований як різкий мінімум коефіцієнта відбиття для плоскополяризованого світла в залежності від кута падіння. При цьому положення резонансного кута θ , напівширина резонансної кривої ΔR та

глибина мінімуму R_{\min} відбиття визначаються як параметрами шару металу, так і оптичними константами зовнішнього середовища [80].

Резонансний кут θ є найбільш специфічною характеристикою, яка визначає процес об'єднання фотонів лазерного світла з коливаннями електронної плазми на зовнішній межі розділу металу. Це об'єднання викликає збудження поверхневих плазмонів та зменшення інтенсивності відбитого світла, що залежить лише від діелектричних властивостей плівки металу та шарів, що знаходяться на поверхні біосенсора, і не порушується процесами розсіювання світла та оптичним поглинанням. Для біосенсорного застосування явища ППР особливо важливою є адсорбція молекул із розчину на поверхні чутливого елементу, що викликає зміни резонансного кута і, відповідно, значення зсуву кута можна використовувати для дослідження процесів адсорбції молекул білків в реальному часі [99].

Поверхнева концентрація чи поверхнєве покриття зв'язаних молекул білка r в одиницях маса/площа (нг/мм) може бути розрахована за експериментально вимірюваними оптичними параметрами адсорбованого шару, такими як коефіцієнт заломлення та товщина, відповідно до наближення, запропонованого Фейтером для однорідних та неоднорідних адсорбційних шарів. Розрахунок концентрації адсорбованих молекул білка здійснюють наступним чином:

$$r = (d n_{\infty} / d c) \cdot (n_D - n_L) \cdot d,$$

де n_{∞} – коефіцієнт заломлення білку на нескінченній відстані від поверхні, c – концентрація білка, n_D та n_L – ефективні коефіцієнти заломлення адсорбованого шару і розчину, відповідно, і d – значення товщини шару білку.

Для оптичного біосенсора, що містить скляну призму, буферний розчин і плівку золота, основна характеристика може бути представлена аналітичною формулою:

$$\Delta\theta_{\text{ппр}}=5300\cdot\Delta nD\cdot d,$$

де $\Delta\theta_{\text{ппр}}$ вимірюється в кутових секундах, а d - в нанометрах.

Звідси видно, що поверхневу концентрацію адсорбованих молекул можна розрахувати, використовуючи дані біосенсора, відповідно до виразу:

$$r=(d n_{\infty}/d c)-1 \cdot (\Delta\theta_{\text{ппр}}/5300),$$

де приріст коефіцієнта заломлення для білків вважається постійним до високих концентрацій, не залежить суттєво від типу білку і має значення $0,188 \text{ см}^3/\text{г}$ [99].

1.3.4. Модифікація поверхні трансдюсера біосенсора на основі ППР. Такі важливі характеристики оптичного біосенсора на основі ППР, як чутливість та специфічність аналізу, стабільність роботи та відтворюваність результатів напряду залежать від стану металізованої поверхні та щільності, структурованості і просторової орієнтації біологічних молекул на ній. Так, біологічні молекули, що слугують чутливим елементом, можуть бути безпосередньо іммобілізовані на металізованій поверхні біосенсора [101].

Проте, разом з тим, раніше було показано, що нанесення на золоту плівку різних покриттів дозволяє збільшити його чутливість. Зокрема, модифікація сенсорної поверхні додекантіолом збільшує її в 1,3 рази [93].

Окрім того, при іммобілізації біологічних молекул звичайною фізичною адсорбцією, або ж на основі поліелектролітних взаємодій, досить немала їх частина може бути блокована внаслідок контакту активних центрів (наприклад антиген-зв'язуючих сайтів) з поверхнею. Щоб уникнути цього недоліку використовують різні підходи, серед яких найпоширенішими є орієнтоване включення біологічних молекул у плівки Ленгмюр–Блоджет різного складу чи попередня іммобілізація на поверхні білка А з *Staphylococcus aureus*, який має сайт зв'язування, розташований на другому домені Fc-фрагменту IgG [93].

1.3.5. Застосування ефекту ППР в біосенсорах та імуносенсорах. Ранні роботи із застосування ефекту ППР в біосенсорах були в основному сфокусовані на взаємодіях антиген-антитіло, стрептавідин-біотинових реакціях, трохи на тестуваннях IgG та, особливо при тестуванні нових алгоритмів у аналізах, на основі біоспецифічних молекулярних взаємодій [43]. Однією з нових площин застосування біосенсорів на основі ППР є тестування взаємодій білок-білок та білок-ДНК і навіть визначення конформаційних змін в іммобілізованому білку. Також було тестовано пухлинний супресорний білок APC відносно його біохімічних властивостей. Роботу було виконано на активаторі мішені в холоферменті РНК-полімерази II [14].

Інша важлива площина – мембранне тестування, так, у випадку з плазматичною мембраною, Ca^{2+} -АТФ-аза є надзвичайно важливою для гомеостазу внутрішньоклітинного Ca^{2+} . Важливим полем застосування є вимірювання кількості рецепторів Т-клітин при взаємодії з сингенними чи аlogenними лігандами [62]

«Бібліотеки» фагових пептидів є могутнім знаряддям у складанні карт епітопів, де взаємодії антитіло-пептид фіксуються біосенсором. Треба зазначити, що це далеко не повний перелік галузей застосування біосенсорів на основі ППР. Якщо говорити про імуносенсиори, то найбільш широким полем їх застосування є моніторинг біопроцесів, що має особливо важливе значення для медичної діагностики. Так, глюкозо- та лактат-біосенсиори є найбільш часто вживаними у ферментативному моніторингу [22]

Часто імуносенсиори використовують для визначення протеїнових молекул, таких як моноклональні антитіла, отримані шляхом використання рекомбінантних мікроорганізмів чи культивованих клітин ссавців. Широке розповсюдження імуносенсорів пов'язано з тим, що вони дозволяють

проводити дослідження в реальному часі і без використання мітки, що робить аналіз більш зручним і значно зменшує кількість похибок.

1.3.6 Способи функціоналізації поверхні біосенсорів, заснованих на ефекті поверхневого плазмонного резонансу (ППР). Безпосереднє виявлення аналізованих речовин на поверхні біосенсорного перетворювача вимагає попередньої іммобілізації на ній одного з партнерів специфічної взаємодії. Виходячи з того, що в більшості випадків не можливо розрізнити специфічно зв'язані і не специфічно адсорбовані молекули, поверхні модифікують полімерами, які мінімізують різні неспецифічні реакції. Ковалентне або афінне зв'язування лігандів на поверхні також дозволяє регенерувати її і таким чином проводити повторні вимірювання [18]. Зазвичай зв'язуючий елемент з більшою молекулярною масою (наприклад, протеїн) іммобілізують на поверхні, а низькомолекулярний компонент (ліганд) знаходиться в розчині. Однак, ситуація може бути і протилежна, коли низькомолекулярні ліганди хімічно фіксовані на поверхні трансдюсера, а високомолекулярні з'єднання знаходяться в розчині.

Хімічний проміжний шар може бути використаний як підкладка для приєднання полімерного покриття або гідрогелю, що надає поверхні високу стійкість до неспецифічної адсорбції білків, нуклеотидів та інших компонентів. Той же шар також може забезпечувати тривимірну структуру для подальшої іммобілізації специфічного селективного матеріалу [33].

Застосування полімерних підкладок для ППР біосенсорів було обмежено головним чином використанням карбоксиметил - декстрану (КМ-декстрану), а також стрептавідину, полілізину, поліетиленгліколю, і полівінілфенілборної кислоти. Було розглянуто можливість використання різних методик іммобілізації антитіл [35].

Як уже згадувалося вище, полімерні шари чутливі до неспецифічної адсорбції. Отже, є необхідність в полімерній основі,

застосування якої посилить сигнал ППР, збільшуючи адсорбцію і зменшуючи неспецифічне зв'язування, дозволяючи, таким чином, використання ППР біосенсорів в складних системах як сироватка або цільна кров. Розглянуто ряд полімерів в якості замінників КМ-декстрану в ролі полімерних підкладок для біосенсорів. Ці полімери є більш вигідними порівняно з КМ-декстраном. Так, були досліджені полісахариди, КМ-гіалуронова, гіалуронова, альгінова, гумінова, полілактанова і поліакрилова кислота, а також ортопіридиллдісульфід-поліетиленгліколь-N-гідроксисукцинімід і з'єднання типу - поліметакрилова кислота-ко-вініл-ацетат. Полімери приєднували хімічно до моношару тіолу на ППР біосенсорі з використанням карбодіімідного методу і потім їх функціоналізували для зв'язування антитіл до міоглобіну (анти-МГ) [2]. Робочі характеристики біосенсора оцінювали, використовуючи міоглобін (МГ) в концентрації 25 нг / мл, тобто біологічно значимий його рівень для виявлення інфаркту міокарда. Результати попередніх досліджень бичачої сироватки показали, що кожен з полімерів продемонстрував менший неспецифічний відгук, ніж біосенсиори, модифіковані КМ-декстраном. Це вказує на те, що зміна полімеру, що підтримує антитіла на поверхні ППР біосенсора може поліпшити його роботу при аналізі сироватки. КМ - гіалуронова кислота, КМ-гіалурон і гіалуронова кислота зменшували кількість неспецифічного зв'язування на поверхні ППР біосенсора приблизно на 60% [19].

Свого роду самозбірний моношар (СЗМ), виготовлений цистамін-глутаральдегідним методом, був застосований для іммобілізації IgM на поверхні ППР біосенсора. Взагалі, формування стабільних моношарів засноване на сильній адсорбції дисульфідів (R-SS-R), сульфідів (R-S-R), і тіолів (R-SH) на металевій (особливо золотій) поверхні. В даному методі, в результаті активізації глутаровим альдегідом (ГА) аміно і сірковмісних молекул, адсорбованих на золотій поверхні, альдегідні групи ГА можуть

приєднуватися до аміногруп IgM молекули з формуванням шіффових основ [52]. Таким чином, вважають, що цистамін-глутаральдегідний метод був відповідним для іммобілізації IgM. Показана можливість багаторазового використання біосенсора, створеного на основі СЗМ. В цьому відношенні він показав кращі результати, ніж при інших методах іммобілізації, що включають адсорбцію протеїну А, конканаваліну А. Десять циклів вимірювань вдається здійснити на одному і тому ж чіпі, обробленому 0.1М розчином HCl після кожного вимірювання. Оперативна стабільність такого біосенсора становила більше 15 днів [50].

Межа чутливості ППР біосенсорів для білків досягає приблизно 1-100 нг/мл. Однак цього часто буває недостатньо для того, щоб проводити вимірювання в біологічних зразках. Поліпшити чутливість ППР біосенсорів можна використовуючи сендвіч метод імунного аналізу або включаючи додаткові взаємодіючі молекули і матеріали, такі як наночастки, ліпосоми, і авідин. Хоча біокаталитичного підсилення сигналу не застосовувалося в ППР біосенсорах, воно успішно використовувалося для посилення сигналу в імунних біосенсорах, заснованих на п'єзокристалах, а також у електрохімічних біосенсорах [13].

ППР привертає увагу дослідників в якості контролю ефективності іммобілізації біологічних молекул на функціоналізованій поверхні без використання мічених компонентів. Даний сенсор знайшов застосування для вивчення ряду біологічних процесів, включаючи ДНК-ДНК, ДНК-білок, і білок-білкові взаємодії. Так, дві 18-членні послідовності ДНК (А і В форми) були іммобілізовані на хімічно модифікованій тонкій золотій плівці в двох окремих місцях. Послідовність А* - точно комплементарна послідовності А і буде безумовно гібридизуватися на місця, функціоналізовані послідовністю А. Ця адсорбція гібридизації призводить до збільшення локального зсуву резонансного кута, що в свою чергу обумовлює зміну коефіцієнта відбиття від поверхні, який визначається

біосенсором. Золоту поверхню модифікували самозбірним моношаром 11-меркаптоандециламіну. Тіол-модифіковану ДНК хімічно приєднували до амінів моношару, що знаходиться на поверхні, з використанням біфункціонального посередника сульфосукцинімідил 4- (N-малеїмідометіл) циклогексан-1-карбоксилату. Для гібридизаційної адсорбції і ДНК і РНК олігонуклеотидів встановлена межа чутливості становить 10 нМ, а для великих 16-S (з 1500 основами) рРНК молекул- 2нм [38].

Для іммобілізації протеїнів також здійснювали модифікацію поверхні ППР біосенсора авідин-біотином. При цьому поверхню золотої плівки насичували бичачим сироватковим альбуміном, міченим біотином (БСА-біотин). Слід зазначити, що надлишок авідина створює стабільний шар, який здатний зв'язати наступний шар біотинильованого протеїну або взаємодіяти з лектином, типу конканаваліну А, через його вуглеводні залишки. Оскільки всі відомі лектини є багатовалентними, що містять два або більше сайтів, що зв'язують вуглевод, то їх можна використовувати як проміжний шар в іммобілізації сандвіч-типу. Поверхню готують шляхом внесення БСА-біотину і авідину (стрептавідину, бактеріальний аналог пташиного глікопротеїду авідину не може бути використаний в цій схемі, тому що він не глікозильований) [14]. Введений конканавалін А взаємодіє з шаром авідину завдяки афінності конканаваліну А до маннозного компоненту вуглеводної частини авідину. Імуноглобулін G (IgG) людини успішно іммобілізували на конканаваліні А через вуглеводні залишки, а потім, використовуючи розпізнавання антиген-антитіло, пов'язували шар IgG кози, специфічних до IgG людини [59].

Розроблено та охарактеризовано ППР біосенсиори для виявлення іонів металів, заснований на металопротеїнах ссавців (МП). МП іммобілізували на карбоксиметил декстрановій матриці. Чіп МП біосенсора пов'язував кадмій (Cd), цинк (Zn) або нікель (Ni), але не магній

(Mn), марганець (Mg) і кальцій (Ca). Чутливість виявлення металів знаходилася на мікромолярному рівні. При зменшенні вмісту NaCl в буфері взаємодії до 1 мМ чіп ефективно диференціював кадмій від цинку і нікелю. Афінність зв'язування між іонами металів і іммобілізованим МП зменшувалася в ряду кадмій > цинк > нікель [54].

Останнім часом зростає інтерес до розвитку нових схем проведення аналізу і способів іммобілізації для отримання біосенсорів з поліпшеними характеристиками. В цьому відношенні знаходить застосування 4-(2-піридилазо) резорцинол (ПАР) як неселективний хелатуючий агент, який формує дуже стабільні, розчинні у воді і добре забарвлені комплекси з величезною кількістю перехідних металів. У ацетатному середовищі (рН 3.0-6.0) ПАР формує червоно-цитрусовий комплекс з цинком у співвідношенні металу і ліганду 1: 2, який може бути визначений спектрофотометрично [60].

При виборі полімерної підкладки з метою створення хімічних сенсорів золь-гель технологія виявилася досить перспективною і детально аналізувалася. Отримані структури мали чудові властивості, такі, як хімічна і температурна стабільність, хімічна інертність, висока чистота, гомогенність і прозорість в широкому діапазоні довжин хвиль від ультрафіолетового до інфрачервоного діапазону [30].

Унікальні властивості наночастинок металів продовжують привертати значну увагу завдяки фізичним властивостям поверхнево-збільшеного розсіювання Рамана. Показано, що розсіювання Рамана для основного класу молекул може бути збільшене, шляхом виготовлення плівок наночастинок колоїдного золота. Останні отримують в результаті хімічного процесу, а потім їх іммобілізують на тонкій золотій плівці. Конфігурація ППР біосенсора надвисокої роздільної здатності відрізняється від звичайного, в якому поверхня покрита лише золотою плівкою. Відомо, що наночастинки золота або срібла в діаметрі <25 нм

підсилюють електромагнітне поле на металевій поверхні [27]. Отже, біосенсиори здатні легко контролювати крихітні зміни концентрації біомолекул на металевій сенсорній поверхні. Окрім того зараз розробляються нові ППР біосенсиори з наночастинками золота, включеними в діелектричну плівку, для досягнення 10-ти кратного посилення можливої роздільної здатності. Метод розпилення, заснований на мультитаргетній системі розпилення, використовували для виготовлення діелектричної плівки (SiO_2) з включеними наночастинками золота. Експериментальні результати газового виявлення і ДНК-гібридизації підтверджують, що запропонований ППР біосенсор з чутливістю, збільшеною за рахунок застосування наночастинок золота, забезпечує досягнення надвисокої роздільної здатності визначення, а саме приблизно 0.1 пг/мм^2 поверхневої оптичної щільності біомолекул [24].

Поверхневі ефекти в наноструктурах обумовлені їх малими розмірами, структурою поверхні, зарядом, водонепроникністю та високим співвідношенням поверхні до об'єму, що створює проблеми для проведення біосенсорного аналізу [28].

Платформа біосенсора вимагає специфічного матеріалу з електричними та оптичними властивостями для ефективного перетворення сигналу біологічної взаємодії у фізичний сигнал. У оптичних біосенсорах біологічний чутливий елемент пов'язаний з оптичною системою перетворювача, і сигнал заснований на поглинанні, люмінесценції або відбиванні [10]. Успішність проведення аналізу залежить від формування якісного біоселективного шару.

Біоселективний шар формується за рахунок іммобілізації біологічного елемента розпізнавання (ферменту, рецепторного білка, молекули зонду, клітини-рецептора тощо) на поверхні перетворювача. Цей шар біологічного розпізнавання (функціоналізована поверхня) служить основою для захоплення цільового аналіту (низькомолекулярної сполуки

(НМС), білку, нуклеїнової кислоти або клітини). Поверхневі параметри перетворювача (ефективна поверхня, шорсткість, пористість), фізичні та хімічні властивості (поверхневий заряд, енергія, валентність/провідність, фізичні стани, функціональні групи, гідроскопічна природа) впливають на формування біоселективного шару [11; 22]. Основною метою біосенсингу є отримання точного та швидкого виявлення цільових біомолекул з високою чутливістю та селективністю. Світло від джерела досягає поверхні, а оптичний сигнал (люмінесценція або відбиття) фіксується до і після іммобілізації біологічно чутливого шару, а також після взаємодії з аналітами. Зміни оптичного сигналу, що виникають при адсорбції цільового аналіту, дозволяють побудувати залежність сигналу біосенсора від концентрації аналіту.

Серед різних матеріалів, які використовуються для формування біоселективного шару перетворювача особливу увагу привертають оксиди металів, які є досить привабливими для застосування у біосенсорному аналізі, оскільки вони володіють усіма необхідними фізичними властивостями (провідністю, люмінесценцією та поглинанням), а також біосумісністю.

Одним з найцікавіших матеріалів на основі оксидів металів є напівпровідник на основі оксиду цинку (ZnO) [34]. Що стосується прогресу у галузі нанотехнології та матеріалознавства, розроблені нові технологічні методи виготовлення шаблонів наноструктур ZnO з великою площею поверхні і додатковими властивостями для використання у біосенсорному аналізі. Наноструктуровані плівки ZnO широко використовувалися як шаблон у електрохімічних біосенсорах, оскільки продемонстрували хорошу чутливість та низьку межу виявлення [30].

Зокрема, оптичні властивості ZnO відкривають чудову можливість використання, як складові біосенсорних платформ. Попередніми дослідженнями було визначено, що тонкі плівки ZnO з вищою

внутрішньою напругою, що використовуються в електрохімічних біосенсорах, демонструють підвищену чутливість до глюкози через кращу передачу заряду [59]. Було показано, що наноструктури ZnO з більшою площею поверхні забезпечують кращу іммобілізацію ДНК на їх поверхні [79].

Саме тому для покращення якості аналізу поліамінів, як маркерів раку грудної залози було обрано методи застосування оптичного біосенсора на основі явища фотолюмінесценції при використанні плівок з наночастинок ZnO та створення біоселективного шару на поверхні вищезгаданих плівок. Це дозволило проводити аналіз поліамінів як у модельних розчинах так і в культурі клітин раку грудної залози швидко та без використання додаткових маркерів та медіаторів.

Сучасні методи діагностики раку грудної залози є фінансово-затратними та вимагають часу й ресурсів, а також не дають можливості провести діагностику на ранніх етапах захворювання, тому пошук економічно доступного, високоточного відтворюваного експрес способу діагностики раку грудної залози є дуже актуальним.

Висновки до огляду літератури.

Створення нових способів і методик визначення поліамінів визначається низкою обставин. З одного боку потрібно розвивати такі напрямки, як: біотехнологія, клітинна біологія, клінічна та лабораторна діагностика ракових захворювань. Наразі потрібен експрес-контроль рівня поліамінів при діагностиці ракових захворювань, що важко забезпечити відомими методами діагностики та аналізу.

З іншого боку – серед існуючих методів діагностики найбільш перспективними і потребує подальшого розвитку та вдосконалення є біосенсорні методи аналізу, які дозволяють точно та в короткі строки визначати рівень необхідних речовин у біологічних рідинах [97]. Так у лабораторній діагностиці різноманітних захворювань вже

використовуються різні типи біосенсорів, однак сьогодні зібрано недостатньо даних щодо використання біосенсорів саме в діагностиці ракових захворювань [5]. Зокрема це пов'язано з необхідністю пошуку нових чутливих маркерів онкологічних захворювань, які дозволили б швидко визначати наявність хвороби та ймовірну стадію захворювання, або ж використовуватися в якості профілактики ракових захворювань ще до їх появи, базуючись на даних концентрації відповідних маркерів у біологічних рідинах пацієнтів [79].

Одними з таких біологічних маркерів які можуть використовуватися в діагностиці онкологічних захворювань, і які, наразі активно досліджуються, є біогенні аміни або поліаміни – спермін, спермідин та путресцин, які є побічними продуктами циклу сечовини, присутні в біологічних рідинах і мають широкий спектр впливу на клітину, наприклад можуть прискорювати поділ клітини, у разі підвищення концентрації поліамінів у клітині, що може виступати ознакою розвитку злоякісного процесу в організмі. Біосенсиори ж можуть виступати у якості потужного аналітичного інструмента і альтернативною технологією швидкого експресного визначення поліамінів [85]. Оптичні імунобіосенсиори на основі явища поверхневого плазмонного резонансу (ППР) мають ряд переваг перед традиційними й іншими інструментальними методами аналізу, зокрема: швидкість отримання результату, можливість проведення аналізу в режимі реального часу, використання прямої реєстрації аналіту, можливість отримати кількісні та якісні показники в залежності від вимог користувача, простота використання, можливість проведення аналізу поза межами лабораторії та більш низька вартість [14]. Крім цього, вони демонструють високу чутливість при визначенні поліамінів, яка перевищує чутливість методу імуноферментного аналізу та йому подібних [44].

2. ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали

Матеріалами для дослідження були високоспецифічна сироватка (ab 26975), отримана шляхом імунізації кролів (компанія Abscam, Кембридж, Англія) проти поліамінів сперміну та спермідину (Sigma-Aldrich, США) Поліаміни отримані в Інституті експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького. Як аналітичний прилад, було використано біосенсор «Плазмонтест» (рис. 2.1), який є оптичним пристроєм, який працює на основі явища ППР, оснащений датчиком із роздільною здатністю 2048 пікселів, який підключається безпосередньо до комп'ютера і реєструє та обробляє прийнятий оптичний сигнал. Пристрій розроблено в Інституті кібернетики ім. В. М. Глушкова НАН України.

2.2. Культивування культури клітин лінії MCF-7

Для проведення досліджень було заплановано використання в якості одного з аналітів клітин культури MCF-7 в умовах *in vitro*. Для цього було здійснено ряд пасажувань культури з використанням середовища DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma-Aldrich, США), об'ємом 5 мл., яке містило у своєму складі ряд речовин необхідних для росту і розвитку клітин культури. Зокрема, згадане вище середовище містило 10% фетальної телячої сироватки, 1% L-лутаміну, 1% пеніциліну та стрептоміцину. Культивування проводили у CO₂ інкубаторі з 5% вмістом CO₂. Спочатку отриману культуру клітин збирали з культурального матрацу (25 см²). Старе середовище зливали та додавали до матрацу 2-3 мл 1% розчину трипсин-EDTA та ставили у інкубатор на 5 хв. Потім, якщо клітини відкріпилися від поверхні матрацу, їх зливали в окрему пробірку та ресуспендували, після чого центрифугували 5 хв. при швидкості 430 g. Після цього робили повторне ресуспендування з додаванням фосфатно-сольового буферу та центрифугували 5 хв при 430 g. Далі ресуспендували

та відбирали клітини в об'ємі 10 мкл та додавали до 10 мкл 1% розчину трипанового синього і вносили в камеру Горяєва для підрахунку клітин та оцінки їх життєздатності. Після чого вносили відповідну кількість клітин в культуральний матрац та додавали культуральне середовище DMEM, і ставили культуральні матраци у CO₂ інкубатор.

Повторне пасажування проводили кожні 4 дні для підтримання оптимальних умов життєдіяльності клітин.

2.3. Характеристика основних робочих параметрів біоенсора на основі ефекту ППР

Для визначення поліамінів за допомогою аналітичного приладу – імуносенсора – на трансдюсерній поверхні іммобілізували специфічні антитіла, що взаємодіяли з клітинними антигенами, завдяки чому реєстрували зсув величини резонансного кута за методикою М. Ф. Стародуба [95].

Поверхня трансдюсера або чіпа, де проводиться імуноаналіз являє собою плівку золота товщиною 50 нм, напилену на скляну пластинку, що приводиться в оптичний контакт з призмою, використовуючи оптично узгоджувальну рідину. Золота плівка формує сенсорну поверхню, де поляризований промінь від напівпровідникового лазерного діода збуджує коливання електронної плазми (поверхневий плазмон). Необхідні умови для збудження плазмону створюються спеціальною призмою, яка може обертатися на контрольований комп'ютером кут. Кутова залежність інтенсивності є основною вихідною характеристикою приладу. Її форма та кутова позиція резонансного мінімуму дозволяють робити оцінку показника заломлення та товщини шару досліджуваного об'єкта. Ефективне загасаюче електричне поле поверхневого плазмону поширюється на відстань близько 200 нм від поверхні плівки золота, що обмежує товщину досліджуваного шару. Кутова позиція ППР змінюється

за найменших змін оптичних характеристик середовища, при цьому прилад фіксує зміни в режимі реального часу. Прилад має два оптичних канали. Другий канал може використовуватись як вимірювальний або як порівняльний.

Прилад «Плазмон – 6» це контрольований комп'ютером оптоелектронний спектрометр з довжиною хвилі 632,8 нм., працюючий на основі явища поверхневого плазмонного резонансу, розроблений на базі інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України.

Імуносенсор «Плазмон-Spr-4М» розроблений в Інституті фізики напівпровідників НАН України. Спектроскопія ППР проводиться в конфігурації Кретчмана з використанням He-Ne лазера з довжиною хвилі 632,8 нм як джерела світла, гоніометра Г-5М, скляної призми та фотодіоду (ФД 263). Для забезпечення оптичного контакту між призмою і металевою плівкою, нанесеною на скляну поверхню, використовували імерсійну рідину (з коефіцієнтом заломлення $n = 1,62$). Імобілізація на поверхні біологічного матеріалу та виникнення з ним специфічних взаємодій супроводжується зміною резонансного кута.

Імуносенсор «Плазмонтест», розроблений в Інституті кібернетики ім. В. М. Глушкова НАН України, – оптичний пристрій на базі ППР, оснащений CCD матрицею на 2048 пікселів, який з'єднується безпосередньо з комп'ютером та реєструє і обробляє отриманий оптичний сигнал. Прилад розроблено в Інституті кібернетики ім. В. М. Глушкова НАН України.

2.4. Попередня модифікація чутливої поверхні

У якості трансдюсера для біосенсора на основі ППР використовували скляну пластинку з напиленням шаром золота товщиною 50 нм розміщали на спеціальній призмі у вимірювальній комірці. Дана пластинка в подальшому слугувала трансдюсером – перетворювачем біологічної

взаємодії в електричний сигнал. Для створення аналітичної системи використовували 0,1М фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS), який вносили в комірку в об'ємі 1 мл. Далі на поверхню трансдюсера наносили розчин білка А від *Staphylococcus aureus* (Sigma) (1 мкг/мл), і витримували його протягом 20 хв. Після ретельного промивання поверхні за допомогою PBS і реєстрації величини резонансного кута, в комірку вносили розчин моноклональних антитіл (Sigma) у концентрації 100 мкг/мл в об'ємі 20 мкл до сперміну чи до спермідину людини. Далі на поверхню трансдюсера наносили розчин бичачого сироваткового альбуміну (БСА) в об'ємі 20 мкл в концентрації 1 мкг/мл. Через 30 хв поверхню трансдюсера промивали за допомогою PBS. та реєстрували величину резонансного кута. Використання БСА обумовлено необхідністю блокування можливих вільних місць на поверхні трансдюсера, які могли залишитись після іммобілізації специфічних моноклональних антитіл.

2.5. Освоєння роботи імуносенсору із запропонованим біочіпом

Для підготовки чіпа ППР, промивали його поверхню дистильованою водою та сушили під струменем повітря. Після чого чіп занурювали в щойно приготований розчин «піраньї» (суміш 3:1 концентрованої H_2SO_4 та 30% H_2O_2) на 2 хв при кімнатній температурі. А потім чіп багатократно промивали дистильованою водою. Оброблений трансдюсер встановлювали на призму приладу, використовуючи імерсійну олію. Золота поверхня слугувала дном проточної вимірювальної комірки об'ємом приблизно 20 мкл. Кільце з силіконової гуми створювало її стінки. Кришка з органічного скла містила в собі отвори для з'єднання з вхідною та вихідною трубками, якими через комірку проходять буферний розчин та дослідні зразки.

Для визначення поліамінів за допомогою імуносенсора, на трансдюсерній поверхні чіпа ППР іммобілізували специфічні антитіла, що

взаємодіяли з клітинними антигенами, і в результаті реєстрували зсув величини резонансного кута. При утворенні на поверхні трансдюсера імунних комплексів спостерігається його відповідний зсув. Зміна величини кута залежить від кількості імунних комплексів, утворених на трансдюцерній поверхні.



Рис. 2.1. Оптичний біосенсор «Плазмонтест»

За допомогою імунобіосенсора реєстрували взаємодію антиген-антитіло в режимі реального часу. Особливістю імуносенсора «Плазмонтест» є те, що чутливий шар формується на скляній пластинці, поверхня якої покрита 50 нм плівкою золота, що забезпечує виникнення ППР [4]. При падінні плоскополяризованого лазерного променя на поверхню шару золота, при визначеному (критичному) куті, виникає явище ППР, яке з'являється при виникненні осциляції щільності зарядів на межі між двома середовищами з металом та діелектриком. Частина енергії променя витрачається на осциляцію, і тому інтенсивність віддзеркаленого променя, при визначеному (критичному) куті зменшується, а кут віддзеркалення є сталою характеристикою конкретного стану трансдюсера. При іммобілізації антитіл на поверхню золота критичний кут, при якому виникає ППР, змінюється і величина зсуву кута перебуває в прямій залежності від концентрації реагенту, який визначається [24]. Зазвичай

чутливість визначення ряду біологічних аналітів перебуває на рівні 5 нг/мл. При перевищенні критичного кута плоскополяризованого променя світла, за найвищого значення коефіцієнта заломлення, відбувається повне внутрішнє віддзеркалення. За цих умов, у поверхневих плазмонних поляритонах спостерігають обумовлений перекачуванням енергії випромінювання, резонансний мінімум залежності інтенсивності відбиття випромінювання від кута падіння лазерного променя на плівку золота. Взаємодія специфічних антитіл із відповідними імуногенами (в нашому випадку поліамінами) реєструється за зміною кута відбиття, за типом зазначеної вище залежності, що обумовлює можливість моніторингу процесу зв'язування антигену з антитілом і, врешті решт, обумовлює високу чутливість при визначенні рівня антигену, а отже і можливість ранньої та статистично достовірної діагностики концентрації поліамінів у клітині. Згідно з останніми літературними даними, іммобілізація антитіл на чисту поверхню золота не є достатньо ефективною для розпізнавання антигенів, оскільки специфічні сайти зв'язування можуть блокуватися, внаслідок того, що антитіла хаотично зв'язуються з поверхнею трансдюсера. Таким чином, рекомендується попередня модифікація поверхні перетворювача за допомогою різних речовин, які забезпечують сайт-специфічне зв'язування антитіл. У таких випадках активність антитіл може збільшуватися до 70 % [21, 22].

2.6. Підготовка біосенсорної поверхні при модифікації пластинки наночастинками ZnO

Перед безпосереднім проведенням аналізу, спочатку виконували модифікацію біосенсорної поверхні – скляної пластинки з ZnO. Спочатку на поверхню пластинки з розчином ZnO наносили розчин білка А в об'ємі 5 мкл і концентрації 20 мкг/мл. Після чого інкубували білок А отриманий з бактерії *Staphylococcus aureus*, на поверхні ZnO протягом 40 хв після чого

виконували промивку 0,85% розчином NaCl. Інкубацію проводили в скляній або пластиковій чашці Петрі, на дно якої спочатку клали фільтрувальний папір, змочений водою, на нього алюмінієву підкладку, а потім пластинку. Чашку Петрі поміщали у холодильну камеру при температурі +4°C. Наступним етапом було внесення глутарового альдегіду в об'ємі 10 мкл на поверхню пластинки та інкубація протягом 20 хв., після чого проводили промивку 0,85% розчином NaCl. Після модифікації пластинки розчином білка А, на поверхню пластинки наносили розчин специфічних антитіл (антисироватка специфічна до спермідину чи сперміну у концентрації 100 мкг/мл і об'ємі 10 мкл, отримані шляхом імунізації кролів спермідином кон'югованим з розчином бичачого сироваткового альбуміну) і проводили інкубацію протягом 40 хвилин з подальшою промивкою 0,85% розчином NaCl. Наступним етапом є нанесення на поверхню пластинки розчину БСА в об'ємі 5 мкл і концентрації 10 мкг/мл та інкубація протягом 20 хв з подальшою промивкою 0,85% розчином NaCl.

Після модифікації біосенсорної поверхні проводили підготовку досліджуваних речовин до аналізу. Для цього готували серію розведень досліджуваних речовин. У випадку суспензії культури клітин раку грудної залози MCF7 готували у концентраціях від 100 до 100000 клітин в 0,85% NaCl, а у випадку розчинів поліамінів (сперміну та спермідину) - від 10 до 100 нг/мл в 0,85% NaCl. Використання розчинів поліамінів необхідно, щоб перевірити нижній та верхній пороги чутливості імунобіосенсора та визначити оптимальну концентрацію поліамінів, яку можна визначати. Використання суспензії культури клітин MCF7 є необхідним для визначення наявності та концентрації поліамінів у клітинах раку та порівняння зі стандартними концентраціями поліамінів у клітинах, і як наслідок, можливості використання даного способу у діагностиці раку грудної залози.

Також можлива додаткова модифікація скляної поверхні з оксидом цинку за допомогою поліанілінгідрохлориду (ПАГ), який дозволяє збільшити чутливу поверхню пластинки, тобто збільшити концентрацію антитіл для подальшого нанесення на пластинку. Для цього на скляну пластинку з оксидом цинку наносили розчин ПАГ і інкубували протягом 20 хв. за кімнатної температури. Далі пластинку промивали дистильованою водою і висушували при кімнатній температурі. Інші операції виконували як зазначено вище.

Вимірювання проводили шляхом перенесення модифікованої скляної пластинки у камеру спектрометра, налаштування відповідної хвилі лазера і внесення досліджуваних речовин. В камеру поміщали речовини в об'ємі 20 мкл. Спочатку в камеру вносили 0,85% розчин NaCl для калібрування приладу. Вимірювання проводили 2-3 хв. В разі незадовільних даних виконували повторне налаштування лазера. Надалі по чергово вносили концентрації досліджуваних речовин. Після закінчення вимірювань кожної окремої концентрації проводили промивку камери 0,85 розчином NaCl.

Отримані дані аналізували за кількістю одиниць люмінесценції, які реєстрували приладом, і передавали на комп'ютер. Прилад реєстрував інтенсивність люмінесценції наночастинок оксиду цинку в залежності від концентрації та молекулярної ваги речовин, кон'югованих на їх поверхні. Так початкова люмінесценція на початку вимірювань може складати 5000-7000 одиниць люмінесценції, яка поступово згасатиме. Це пояснюється насиченням самої пластинки і блокуванням усіх специфічних місць зв'язування на чутливому шарі. Отже використання наночастинок оксиду цинку дозволяє як якісно, так і кількісно визначити рівень поліамінів, як в розчині поліамінів, так і у ліофілізатах клітин.

2.7. Процедура аналізу з використанням біосенсора на основі ППР

Отже, підготовку робочої поверхні біосенсора було виконано таким чином. Спочатку ми покривали золоту поверхню трансдюсера

поліелектролітною гідрофобною плівкою з поліаліламінгідрохлориду (ПАГ) в концентрації 1 мг/мл, потім іммобілізували на поверхні трансдюсера білок А, отриманий з *Staphylococcus aureus* у концентрації 1 мг/мл. Після нанесення білка А на поверхню трансдюсера адсорбували поліклональні антитіла, специфічні до сперміну, спермідину та путресцину. Для імунізації кролів було отримано кон'югати поліамнів з бичачим сироватковим альбуміном, оскільки вони є гаптенами та не здатні індукувати імунну відповідь. Кон'югацію здійснювали за допомогою глутарового альдегіду, а очистку отриманого кон'югату проводили колонковою хроматографією з використанням в якості сорбенту сефадексу G-10. Схема імунізації кроликів включала введення 200 мкг антигену внутрішньо шкірно (по 5 ін'єкцій з обох сторін в верхній частині спини), кожні 2 тижні на протязі 3-х місяців.

В кінці імунізації з отриманої сироватки виділяли фракцію IgG за допомогою преципітації сульфатом амонію. Сульфатну фракцію IgG розчиняли в тріс-HCl буфері рН 7,3 та діалізували проти цього буфера. Потім наносили бичачий сироватковий альбумін (БСА) для блокування можливих вільних ділянок на золотій поверхні, в концентрації 1мг/мл. Нанесення БСА майже не змінило величину резонансного кута, що може свідчити про відсутність на робочій поверхні імуносенсора вільних місць для зв'язування, а концентрація антитіл була достатньою для створення максимально щільного шару. Наступним етапом експерименту було нанесення розчинів різних концентрацій поліамнів сперміну, спермідину та путресцину.

З основного розчину ми підготували робочі розчини різної концентрації поліамнів від 5 до 1000 нг/мл. Час експозиції кожного зразка був у межах від 5 до 10 хв за температури 25 °С. Після нанесення кожного зі зразків поліамнів спостерігали зміну резонансного кута. На кожному

етапі промивали комірки фізіологічним розчином. Після цього було створено та проаналізовано калібрувальні криві.

Оскільки аналізовані поліаміни імунологічно є гаптенами, серед різних алгоритмів аналізу використовувались три: Перший – «прямий», коли іммобілізоване специфічне антитіло безпосередньо взаємодіє з антигеном (рис. 2.2). У цьому методі іммобілізували специфічні антитіла безпосередньо на поверхні трансдюсера лише за рахунок фізичної сорбції та модифікації поверхні за допомогою ПАГ, білка А та БСА, після чого почали вимірювати резонансний кут для визначення оптимальної концентрації поліамінів.



Рис. 2.2. Прямий алгоритм аналізу поліамінів: РК – резонансний кут, ПАГ – поліаліламінгідрохлорид, БСА – бичачий сироватковий альбумін

Другий – «до насичення», за якого попередньо іммобілізовані специфічні антитіла до сперміну, спермідину та путресцину кон'югували з вільними поліамінами, а потім із поліамінами, кон'югованими з БСА. Остання процедура була виконана за допомогою глутаральдегіду (рис. 2.3).



Рис. 2.3. Алгоритм аналізу поліамінів «до насичення»: РК – резонансний кут, ПАГ – поліаліламінгідрохлорид, БСА – бичачий сироватковий альбумін



Рис. 2.4. Конкурентний алгоритм аналізу поліамінів: РК – резонансний кут, ПАГ – поліаліламінгідрохлорид, БСА – бичачий сироватковий альбумін

Третій алгоритм аналізу – конкурентний. Використовуючи конкурентний алгоритм аналізу, було кон'юговано досліджувані поліаміни з БСА (за допомогою глутаральдегіду), іммобілізованого на поверхні трансдюсера. Потім було додано суміш вільних поліамінів і антитіл до такого специфічного шару (рис. 2.4).

2.8. Статистична обробка результатів дослідження

Для обробки результатів використовували статистичну програму Microsoft Excel. Для кожної групи даних робили обрахунки таких показників: середнє арифметичне із стандартною середньою похибкою. Кожен зразок вимірювали у 4-х повторах. Результат експерименту визначали як середнє значення, отримане для усіх чотирьох повторів.

Для визначення статистичної достовірності показників використовували критерій Стюдента, а також однофакторний дисперсний аналіз. Різницю вважали достовірною на рівні значущості 95 % ($p \leq 0,05$).

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Розробка імуносенсорної тест-системи

В основі визначення поліамінів за допомогою оптичного імуносенсора на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу лежить взаємодія специфічних антитіл, іммобілізованих на трансдюцерній поверхні золотого чипа, з клітинними антигенами. В результаті реєструється зсув величини резонансного кута.

Оптичні імуносенсиори на основі явища поверхневого плазмонного резонансу мають ряд переваг перед традиційними та іншими інструментальними методами аналізу, а саме: швидкість отримання результатів, можливість проведення аналізу в реальному часі, використання прямої реєстрації аналіту, можливість отримання кількісних і якісних показників в залежності від вимог користувача, простота у використанні, можливість проведення аналізу за межами лабораторії та його дешевизна. Крім цього, вони демонструють високу чутливість при визначенні мікроорганізмів, яка в декілька разів перевищує чутливість методу твердофазного імуноферментного аналізу.

Імуносенсорна тест-система на основі поверхневого плазмонного резонансу включає розробку методик попередньої підготовки чутливої поверхні імуносенсору та зразків для аналізу.

Імуносенсорна тест-система на основі поверхневого плазмонного резонансу включає розробку методик попередньої підготовки чутливої поверхні імуносенсору та зразків для аналізу.

3.1.1. Підготовка компонентів чутливої поверхні трансдюсера імунного біосенсора. Першим кроком для створення ефективної імуносенсорної тест-системи є підготовка трансдюсера. Трансдюсером називають сенсорний біочип, що складається із декількох шарів.

Перший шар прозорий для оптичного дослідження матеріалу – це призма, що дозволяє реалізувати умови для збудження поверхневих плазмонів. Імерсійна олія забезпечує її з'єднання з іншими елементами оптичної системи. Другий шар – шар зв'язування, тобто такий, що забезпечує абсорбцію біомолекул на поверхні сенсорного чіпа. Третій шар – іммобілізуюча матриця (ліганд), і четвертий шар – біомолекули, що аналізуються (аналіт).

Для того, щоб створити специфічне зв'язування на сенсорній поверхні трансдюсера, її модифікують рецепторами – антитілами, або антигеном в залежності від сполуки, що визначається.

Для визначення поліамінів за допомогою оптичних імунобіосенсорів на основі явища ППР використовували варіант ППР, де, у якості трансдюсера (сенсорного чіпа) використовується тонка плівка золота (45–50 нм), що наноситься на скляну пластинку шляхом напилення у вакуумі. В якості імуносенсорного аналітичного приладу для розробки алгоритму імуноаналізу та оптимізації методики використовували оптичний спектрометр «Плазмонтест». Поверхню трансдюсера попередньо обробляли розчином поліаліламінігідрохлориду (ПАГ) у концентрації 20 нг/мл, іммобілізували білок А зі *Staphylococcus aureus* в концентрації 20 нг/мл в фосфатно-сольовому буферному розчині (PBS).

3.1.2. Проведення імуноаналізу за допомогою ППР. Для активації сенсорного чіпа (трансдюсера) в комірку імуносенсора вводили розчин PBS та реєстрували зсув рефракторного кута. Межу детекції імуносенсора співставляли зі зміною сигналу на 0,1 градуса, що відповідає поверхневій щільності білка, зв'язаного з біосенсорною поверхнею. Для визначення поліамінів проводили модифікацію поверхні золота ПАГ, а потім білком А *Staphylococcus aureus*, який має чотири домени зв'язування Fc фрагментів молекули IgG. Для уникнення неспецифічного зв'язування антигену з поверхнею золота відкриті ділянки блокувались БСА. В результаті

визначення поліамінів у модельних розчинах чутливість біосенсору «Плазмонтест» знаходилася в межах 5 – 1000 нг/мл. На наступній стадії після промивки трансдюсера PBS на його поверхні іммобілізували БСА і її знову промивали за допомогою PBS. Тривалість кожної стадії попередньої обробки трансдюсерної поверхні сягала 10 – 15 хвилин при кімнатній температурі. По закінченні попередньої обробки трансдюсерної поверхні реєстрували величину резонансного кута в присутності PBS. Після цього комірку, де знаходиться трансдюсерна поверхня, наповнювали досліджуванним розчином, що містив сироватку крові, та фіксували величину резонансного кута. При утворенні на поверхні трансдюсера імунних комплексів спостерігали зсув резонансного кута. Зміна величини кута залежить від кількості імунних комплексів, утворених на трансдюсерній поверхні. Попередньо підготовлені трансдюсерні поверхні можуть зберігатись (в підсушеному на повітрі вигляді за кімнатної температури) до 10 днів за температури +2 – +6 °С. Такі поверхні можуть бути потім використані при необхідності. У такому разі спочатку реєстрували резонансний кут при введенні у вимірювальну комірку PBS (20 мкл). Потім у неї вводили розчин поліамінів у різних концентраціях, витримували його 10–15 хв. при кімнатній температурі. Комірку промивали PBS та реєстрували зсув резонансного кута. При перевищенні критичного кута плоскополяризованого променя світла, за найвищого значення коефіцієнта заломлення, відбувається повне внутрішнє віддзеркалення. Взаємодія антигену із специфічними до поліамінів антитілами реєструється за зміною відбиття резонансного кута по типу залежності, що обумовлює можливість моніторингу процесу зв'язування антигену з антитілом і врешті решт обумовлювати високу чутливість при визначенні рівня антигену, а значить і можливість експрес-індикації поліамінів.

3.2. Визначення алгоритму аналізу

Спочатку ми визначали чутливість біосенсора за допомогою ряду концентрацій розчинів поліамінів від 5 до 1000 нг/мл. Також ми використовували різні алгоритми аналізу для оптимізації процедури аналізу. Згідно з отриманими даними можна стверджувати, що діапазон чутливості нашого біосенсора для сперміну, спермідину та путресцину становить від 5 нг/мл до 1000 нг/мл, а мінімальна концентрація, за якої ми бачимо чіткий відгук біосенсора, становить близько 10 нг/мл (табл. 3.1).

Найбільший зсув резонансного кута ми могли спостерігати при прямому та конкурентному алгоритмі аналізу, тому що зсув резонансного кута за мінімальної концентрації в 10 нг/мл, за якої ми можемо виявити чіткий сигнал зміни резонансного кута, становить 0,015 градусів та у сперміну, 0,012 градусів у спермідину та 0,07 градусів у путресцину. При конкурентному алгоритмі аналізу хоча відхилення резонансного кута є меншим, ніж при прямому алгоритмі аналізу, відхилення є більшим, ніж при алгоритмі «до насичення», і приконцентрації 10 нг/мл становить 0,010 у сперміну, спермідину та путресцину. Також, згідно з отриманими даними, можна спостерігати, що відхилення резонансного кута при аналізі сперміну є найбільшим у порівнянні з іншими поліамінами, що може бути пов'язане з високою спорідненістю антитіл до цих поліамінів (рис. 3.1, рис. 3.2, рис. 3.3).

Отже, можна сказати, що розроблена біосенсорна тест-система може детектувати як наявність поліамінів, так і їх кількість у розчині, що може бути використано в подальших дослідженнях для розроблення повноцінної методики для діагностики раку грудної залози на ранній стадії захворювання.

Таблиця 3.1. Визначення оптимальної концентрації поліамінів сперміну, спермідину та путресцину завдяки аналізу відхилення резонансного кута

	спермін	спермідин	путресцин	спермін	спермідин	путресцин	спермін	спермідин	путресцин
	Прямий			до насичення			конкурентний		
Концент- рація нг/мл	зміни резонансного кута, град. °.								
5	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
10	0,015	0,012	0,010	0,007	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
25	0,030	0,024	0,015	0,015	0,015	0,015	0,025	0,020	0,020
50	0,045	0,040	0,020	0,025	0,025	0,020	0,050	0,030	0,030
100	0,090	0,055	0,030	0,050	0,035	0,030	0,080	0,045	0,040
150	0,175	0,075	0,050	0,075	0,045	0,040	0,140	0,060	0,060
200	0,260	0,095	0,070	0,100	0,060	0,060	0,200	0,080	0,080
250	0,350	0,120	0,090	0,125	0,075	0,080	0,260	0,100	0,100
500	0,450	0,150	0,110	0,160	0,090	0,100	0,320	0,130	0,120
1000	0,550	0,190	0,130	0,200	0,120	0,110	0,380	0,160	0,140

Також цей метод аналізу може бути досить швидким, якщо зробити попередню модифікацію поверхні перетворювача перед початком аналізу. У цих умовах вся процедура аналізу може бути виконана за 20 хвилин.

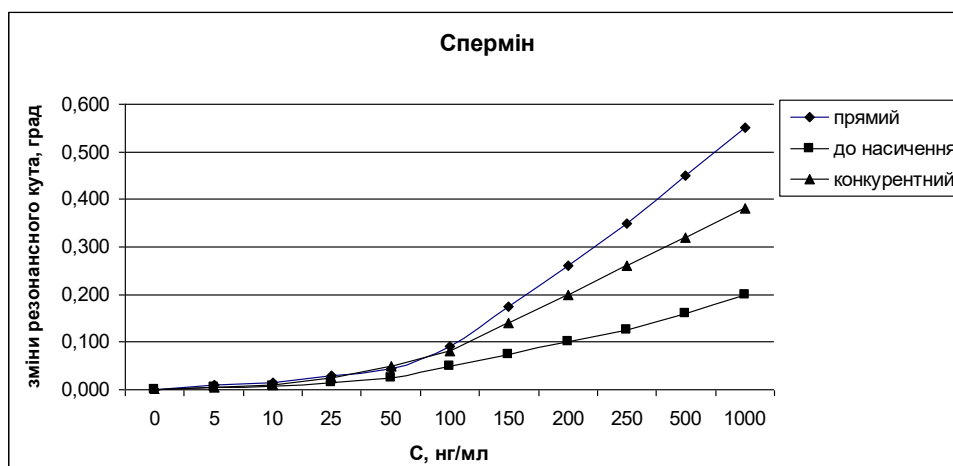


Рис. 3.1. Визначення оптимальної концентрації сперміну

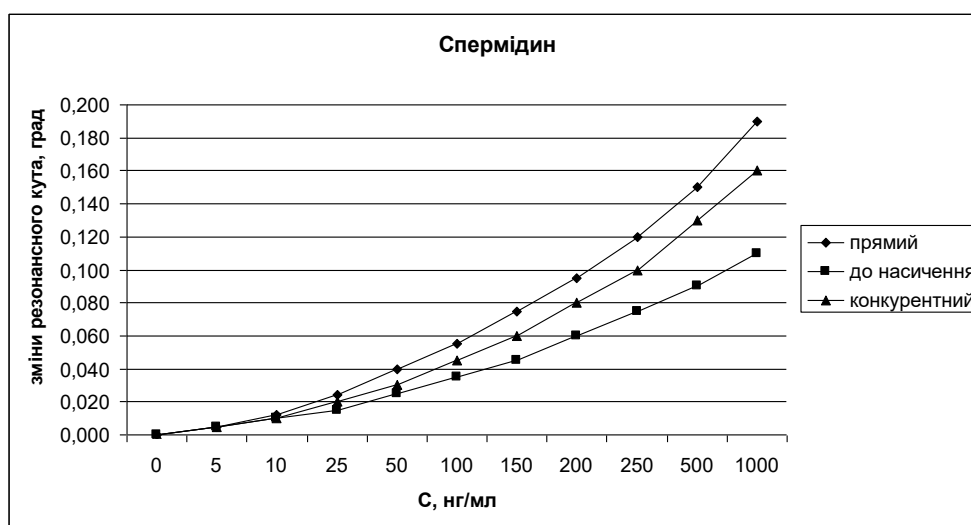


Рис. 3.2. Визначення оптимальної концентрації спермідину

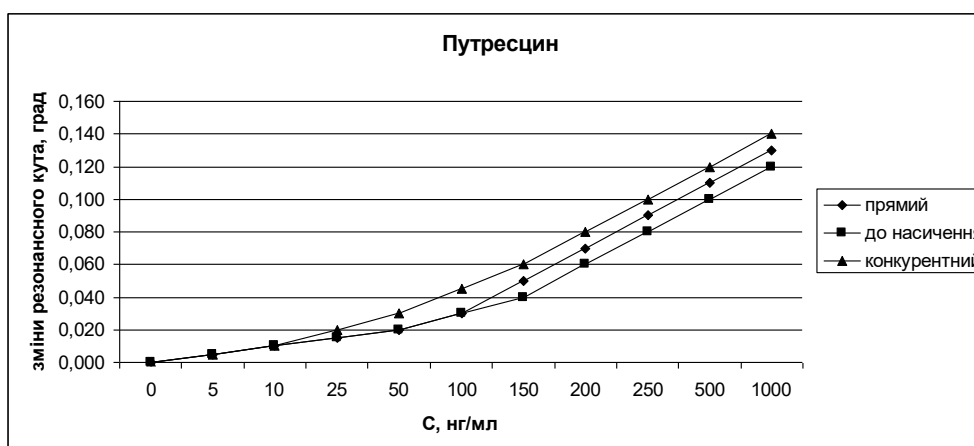


Рис. 3.3. Визначення оптимальної концентрації путресцину

3.3 Визначення оптимальної концентрації поліамінів в модельних розчинах

Наступним етапом стало визначення оптимальної концентрації поліамінів у модельних розчинах. При проведенні аналізу сенсограма біосенсора відображала відхилення резонансного кута протягом аналізу як сперміну так і спермідину. Відхилення резонансного кута збільшувалося з введенням кожної нової концентрації поліамінів (рис. 3.4, рис. 3.5).

В процесі дослідження були отримані дані, що показують зміни резонансного кута як при модифікації поверхні трансдюсера так і при нанесенні на поверхню перетворювача розчинів поліамінів. Так, було встановлено, що відхилення резонансного кута збільшуються з нанесенням

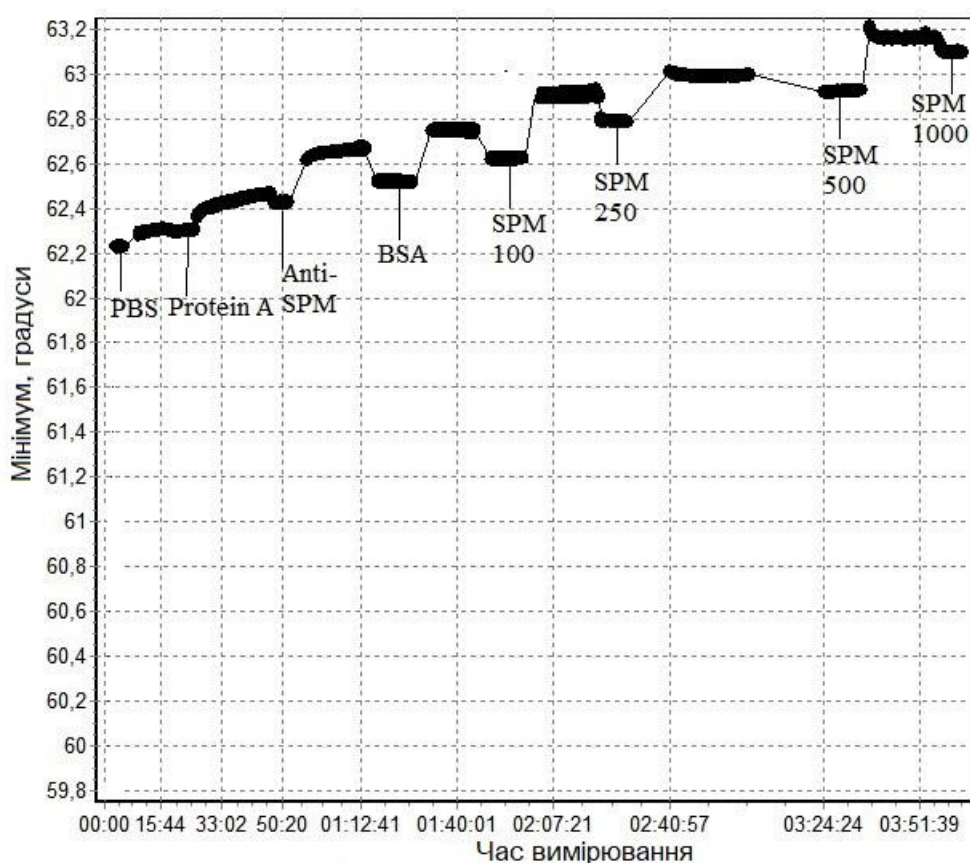


Рис. 3.4. Сенсограма зміни резонансного кута при визначенні оптимальної концентрації спермідину за допомогою оптичного біосенсора на основі явища ППР в модельних розчинах

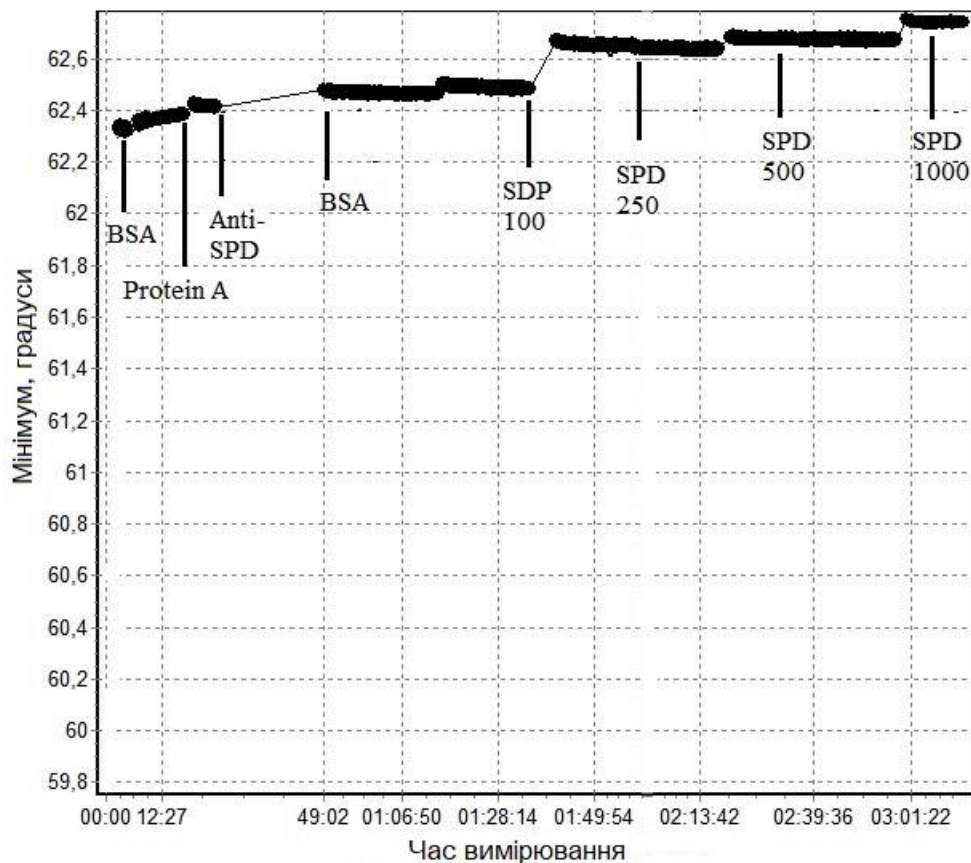


Рис. 3.5. Сенсограма зміни резонансного кута при визначенні оптимальної концентрації спермідину за допомогою оптичного біосенсора на основі явища ППР в модельних розчинах.

відповідних речовин на поверхню трансдюсера, як при дослідженні сперміну так і при дослідженні спермідину (рис 3.6). В обох випадках при модифікації поверхні трансдюсера спостерігаються незначні відхилення резонансного кута, отже дані речовини детектуються однаково, і модифікація поверхні проходить за однакових умов (рис. 3.7). Так при нанесенні PBS при дослідженні сперміну величина резонансного кута становить 62,26 градуси, а для спермідину - 62,42 градуси.

При внесенні в вимірювальну комірку білка А за дослідження сперміну, резонансний кут становить 62,30, а для спермідину – 62,46 градуси. За наявності антитіл у вимірювальній комірці резонансний кут при дослідженні сперміну становив 62,35 градусів, а при дослідженні

спермідину – 62,50. При нанесенні бичачого сироваткового альбуміну за дослідження сперміну зазначений вище кут становить 62,40 градуси, а при дослідженні дослідженні спермідину - 62,55 (табл. 3.2).

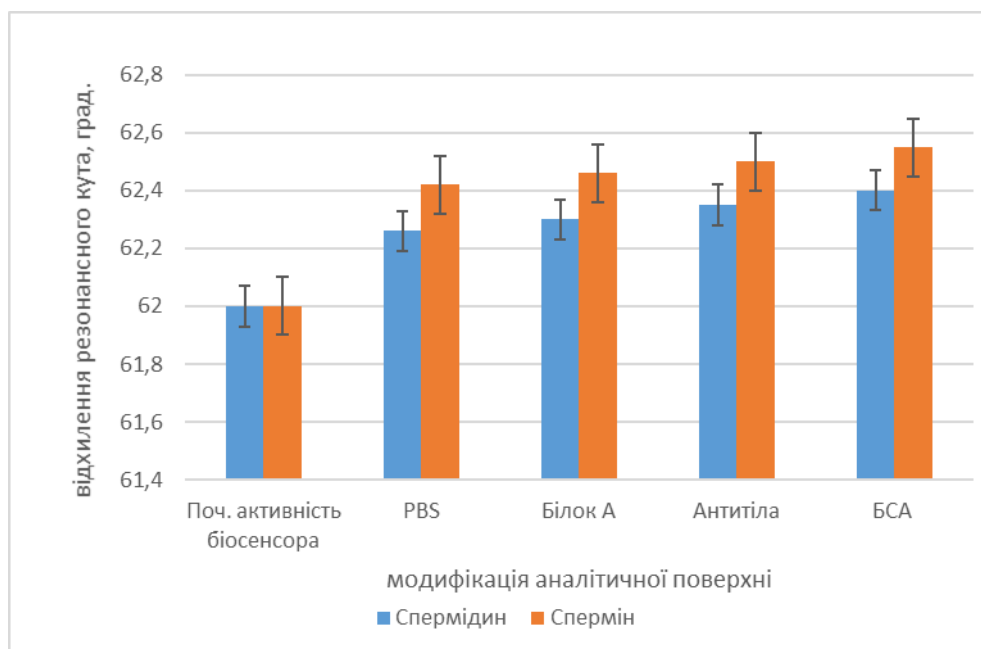


Рис. 3.6. Зміни резонансного кута при модифікації поверхні трансдюсера біосенсора на основі ППР для покращення якості аналізу.

При аналізі поліамінів сперміну та спермідину біосенсор показав значне відхилення резонансного кута від значень, характерних для речовин, які реєструвались при підготовці чутливої поверхні трансдюсера, отже можна сказати що була виявлена наявність поліамінів на поверхні трансдюсера, як результат утворення комплексу між ними і спорідненими до них антитілами. Також було встановлено, що мінімальна концентрація поліамінів, за якої біосенсор був здатний їх детектувати, становить 10 нг/мл. Менші концентрації як сперміну так і спермідину не виявлялися біосенсором і були визнані не значущими. Максимальна концентрація, яку вдалось реєструвати, становила 1 мкг/мл що очевидно є результатом заповнення вільних місць на чутливій поверхні трансдюсера. Також було

показано, що спермін є більш афінним до антитіл, оскільки відхилення резонансного кута при концентрації в усіх концентраціях значно вищі ніж у спермідину (табл. 3.3)

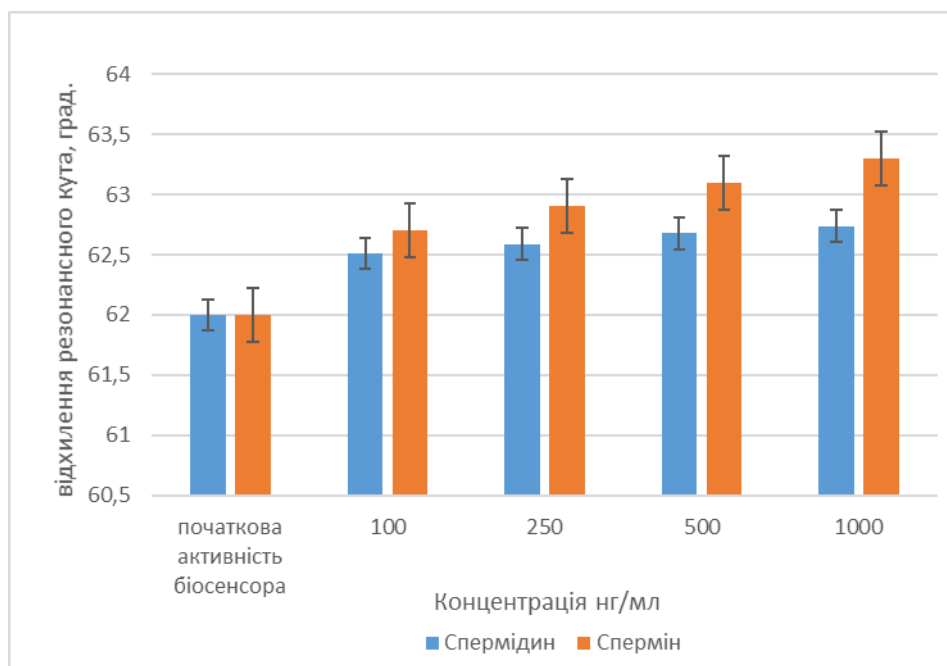


Рис. 3.7. Зміни резонансного кута при визначенні оптимальної концентрації спермідину та сперміну за допомогою оптичного біосенсора на основі явища ППР в модельних розчинах.

Через кращу реактивність сперміну та задля уникнення перехресної реакції з іншими поліамнами у разі антитіл було вирішено у подальшому використовувати лише антисироватку проти сперміну, а також лише спермін у якості аналіту у модельних розчинах. Дані проведених досліджень на модельних розчинах сперміну у подальшому використовуватимуться для побудови калібрувальної кривої для аналізу зразків сироватки крові хворих на рак грудної залози.

Таблиця 3.2. Зміна резонансного кута при підготовці чутливої поверхні при дослідженні поліамінів сперміну та спермідину.

	Спермін	Спермідин
Концентрація	Резонансний кут (кут.сек), градуси	
PBS	0	0
Білок А	0.04 ±0,002	0.04 ±0,002
Моноклональні анти-спермінові антитіла	0.09±0,004	0.08±0,004
БСА (бичачий сироватковий альбумін)	0.14±0,007	0.13±0,006

Таблиця 3.3. Зміна резонансного кута при визначенні оптиманої концентрації, яку може визначати біосенсор на модельних розчинах сперміну та спермідину.

	Спермін	Спермідин
Концентрація (нг/мл)	Резонансний кут (кут.сек), градуси	
10	0.15±0.007	0.11±0.005
25	0.36±0.02	0.19±0.009
50	0.55±0.03	0.28±0.02
100	0.75±0.03	0.34±0.02

3.4. Побудова калібрувальної кривої для визначення межі чутливості біосенсора на основі ППР з використанням поліамінів сперміну

Для визначення концентрацій поліамінів сперміну попередньо було визначено діапазон чутливості біосенсора на основі ППР. Для проведення аналізу чутлива поверхня біосенсора була попередньо модифікована

розчином білка А, та заблоковані неспецифічні сайти зв'язування за допомогою БСА. Межі цієї калібрувальної кривої залежали від концентрації сперміну. Нижчий рівень чутливості становив 5–6 нг/мл. Верхня межа чутливості біосенсора становила 1000 нг/мл. За отриманими даними при кожному підвищенні концентрації сперміну зміна резонансного кута змінювалася в діапазоні 62,8–65,6 градусів. Оптимальні концентрації знаходилися в межах 63,1–64,1 градусів при 100 нг/мл. Резонансний кут змінювався в середньому на 0,2–0,4 градуси. Отримані дані реєстрували та аналізували. Подальше підвищення концентрації сперміну біосенсор не виявляв.

Сенсограми реєстрували зміни величини кута на 1 секунду реального часу. Кількість вимірювань варіювалася від 5 до 1000 для кожного зразка. Всі дані були зафіксовані в програмі Plasmon 7.0 (Інститут кібернетики ім. Глушкова, Україна).

Як видно із сенсограми (рис. 3.8), зсув резонансного кута під час аналізу зразків сперміну був вищим, хоча молекулярна маса БСА і білка А вища, ніж у поліамінів. Це зумовлено здатністю біосенсора «Плазмонтест» виявляти низькомолекулярні аналіти, а також виявляти реакцію антиген-антитіло, що також спричинює появу більш високої величини кута відхилення під час аналізу. Отримана калібрувальна крива дозволить перевірити наявність і вміст поліамінів у сироватці крові хворих на рак грудної залози. Сенсограма показує постійне підвищення рівня поліамінів під час додавання нової концентрації. Сенсорні здібності біосенсора не блокуються великими молекулами, оскільки вони орієнтовані на виявлення низькомолекулярних речовин (рис. 3.8, рис. 3.9).

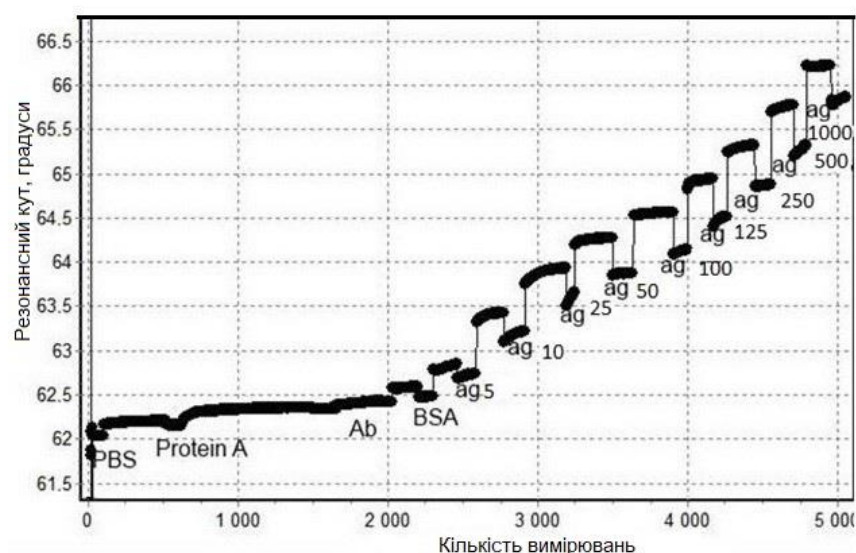


Рис. 3.8. Сенсограма відгуку біосенсора при різних концентраціях сперміну: PBS - забуферений фосфатом фізіологічний розчин; BSA - бичачий сироватковий альбумін; Ab - анти-спермінова сироватка; Ag - спермін (5 нг/мл – 1000 нг/мл).

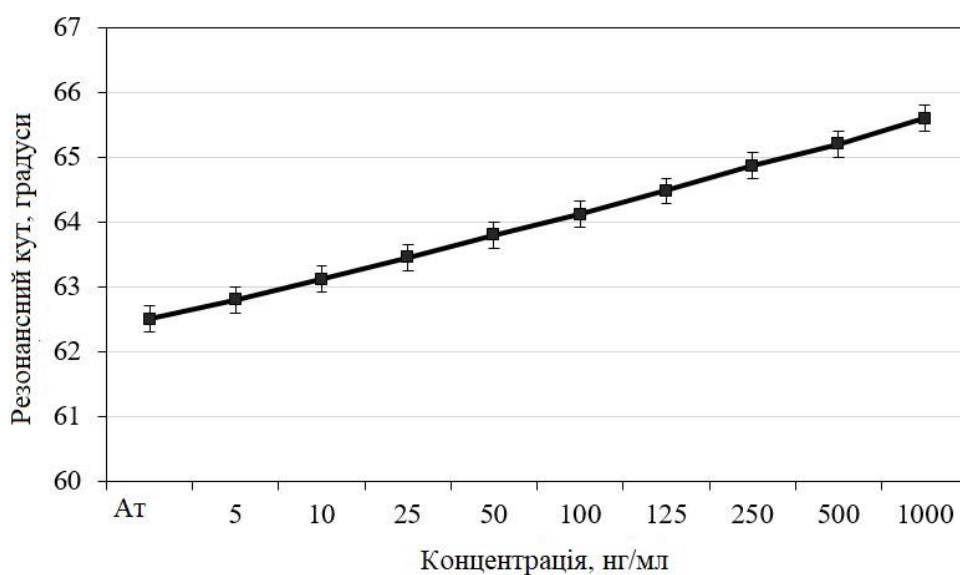


Рис. 3.9. Калібрувальна крива концентрації поліамінів сперміну

Створена калібрувальна калібрувальна крива дозволить перевірити наяність та визначити, в подальших дослідженнях, вміст поліамінів в крові хворих на рак грудної залози.

3.5. Культивування культури клітин MCF-7 для подальшого проведення біосенсорного експрес-тесту

MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) - епітеліоподібна клітинна лінія, отримана з інвазивної аденокарциноми проток грудної залози людини. Клітинна лінія MCF-7 зберігає кілька характеристик диференційованого епітелію грудної залози, включаючи здатність реагувати на естрадіол через цитоплазматичні рецептори естрогенів і здатність утворювати домени. Фактор некрозу пухлини (TNF α) пригнічує ріст клітин MCF-7. Клітинну лінію раку грудної залози MCF-7 мишей було обрано якості моделі, аби дослідити чи можливе визначення поліамінів у культурі клітин, а також межі його чутливості. Для цього культуру кліти культивували з використанням середовища DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma-Aldrich, США), Середовище мало у своєму складі 10% фетальної телячої сироватки, 1% l-лутаміну, 1% пеніциліну та стрептоміцину. Культивували у CO₂ інкубаторі з 5% вмістом CO₂. Спочатку, отриману культуру клітин, збирали з культурального матрацу (25 см²). Старе середовище зливали та додавали до матрацу 2-3 мл 1% розчину трипсин-EDTA та ставили у інкубатор на 5 хв. Потім, якщо клітини відкріпилися від поверхні матрацу їх зливали в окрему пробірку та ресуспендували, після чого центрифугували 5 хв. при швидкості 430 g. Після цього робили повторне ресуспендування з додаванням фосфатно-сольового буферу та центрифугували 5 хв. при швидкості 430 g. Далі ресуспендували та відбирали клітини в об'ємі 10 мкл та додавали до 10 мкл 1% розчину трипанового синього та вносили в камеру Горяєва, для підрахунку клітин та оцінки їх життєздатності. Після чого вносили відповідну кількість клітин в культуральний матрац та додавали культуральне середовище DMEM. Після чого ставили культуральні матраци до CO₂ інкубатора. Результати культивування перевіряли кожен

другий та четвертий день та оцінювали і морфологію під інвертованим мікроскопом (фірма Leica, Німеччина), (рис. 3.10, рис. 3.11).

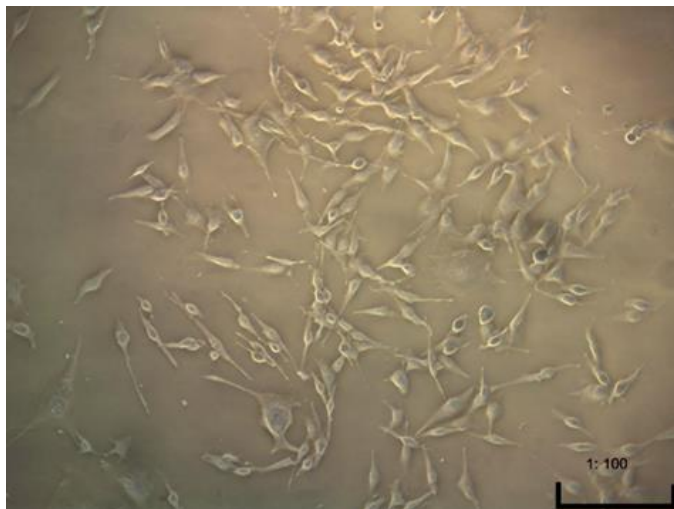


Рис. 3.10. Культура клітин MCF-7 на 2 день культивування. Збільшення:
x200

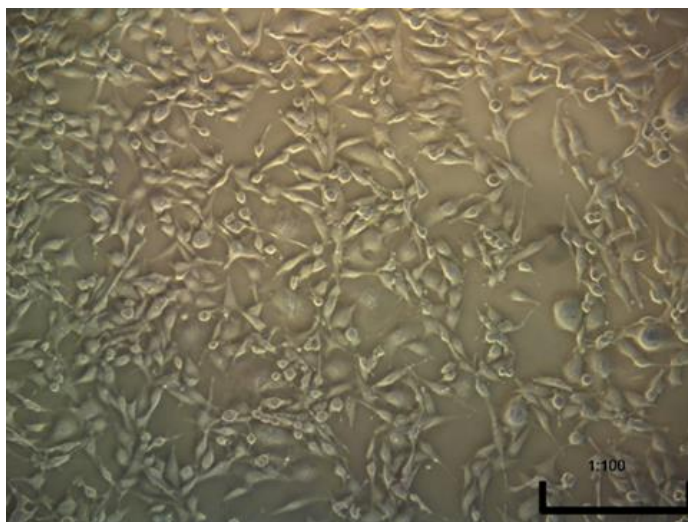


Рис. 3.11. Культура клітин MCF-7 на 4 день культивування. Збільшення:
x200

В результаті культивування утворювались колонії клітин епітеліального типу з ексцентричним ядром та витягнутою на кінцях цитоплазмою у кількості в середньому 2×10^5 клітин на один культуральний

матрац. Отримані клітини в подальшому використовувались для імунологічних аналізів з використанням біосенсора.

3.6. Визначення поліамінів у модельних розчинах та культурі клітин *in vitro* MCF-7

Результати тестування різних концентрацій поліамінів та клітин культури MCF7 представлені у нижченаведеній Таблиці 3.4:

Результати досліджень свідчать про те, що, обрана специфічна антисироватка до сперміну та спермідину (антитіло) достатньо якісно і надійно спроможна зв'язуватися з антигеном – досліджуваними поліамінами, а відтак, може забезпечувати високоякісну ідентифікацію наявності та концентрації поліамінів в суспензії клітин MCF-7. Спостерігається поступове зниження інтенсивності фотолюмінесценції зі збільшенням концентрації досліджуваної речовини. При концентрації 10 нг/мл., інтенсивність фотолюмінесценції становить 6700 одиниць (Фл. од.) у сперміну, яка є вищою в порівнянні 6500 одиць у спермідину, однак є значно нижчою у порівнянні з 7500 одиниць при концентрації 100 кл/мл зразків клітин раку грудної залози MCF-7. Спостерігається поступове зниження інтенсивності фотолюмінесценції зі збільшенням концентрації досліджуваної речовини. При концентрації 10 нг/мл., інтенсивність фотолюмінесценції становить 6700 одиниць (Фл. од.) у сперміну, яка є вищою в порівнянні 6500 одиць у спермідину, однак є значно нижчою у порівнянні з 7500 одиниць при концентрації 100 кл/мл зразків клітин раку грудної залози MCF-7. При дослідженні концентрації в 20 нг/мл інтенсивність фотолюмінесценції вища при дослідженні сперміну ніж при дослідженні спермідину і становила 6450 од. у сперміну проти 6300 од. у спермідину. При дослідженні зразків культури клітин раку грудної залози MCF-7 при підвищенні кількості клітин до 500 кл/мл спостерігали зниження інтенсивності люмінесценції, яка становила 7000 од. в

порівнянні з початковою інтенсивністю люмінесценції при концентрації в 100 кл/мл, однак вищою в порівнянні інтенсивністю сперміну та спермідину. Це може свідчити що концентрація поліамінів в клітинах раку грудної залози у заданій кількості клітин може перевищувати значення у 10-20 нг/мл поліамінів.

Таблиця 3.4. Визначення інтенсивності фотолюмінесценції поліамінів в модельних розчинах та ліофілізатах клітин раку грудної залози за допомогою імцнобіосенсору на основі ZnO ($M \pm m$, $n=6$)

Спермін		Спермідин		MCF-7	
Концентрація нг/мл	Фотолюміне сценсенція Фл. од.	Концентрація нг/мл	Фотолюміне сценсенція Фл. од.	Концентрація кл/мл	Фотолюмін есценсенція Фл. од.
10	6700±222,1	10	6500±196,3	100	7500±196,3
20	6450±191,3	20	6300±188,3	500	7000±238,8
30	6300±188,3	30	6200±186,5	1000	6600±257,5
50	6100±184,2	50	6000±182,6	5000	6300±285,8
70	5900±175,5	70	5850±173,9	10000	6000±344,5
100	5800±161,8	100	5700±168,6	100000	5900±388,7

Аналізуючи концентрацію поліамінів сперміну та спермідину в 30 нг/мл було встановлено, що інтенсивність люмінесценції у сперміну становить 6300 од., у сперміну у порівнянні зі спермідиним і становитиме 6200 од. Однак, досліджуючи інтенсивність люмінесценції у визначеній концентрації клітин раку грудної залози а саме 1000 кл/мл було встановлено, що хоча кількість одиниць люмінесценції і нижча у порівнянні з меншими концентраціями клітин, однак вона значно вища у

порівнянні з інтенсивністю фотолюмінесценції сперміну та спермідину і становить 6600 од.

При концентрації поліамінів у 50 нг/мл спостерігали попередню тенденцію щодо того, що інтенсивність фотолюмінесценції сперміну вища ніж спермідину і становить 6100 од. у порівнянні зі спермідином у 6000 од. Інтенсивність люмінесценції при дослідженні 5000 кл/мл лінії MCF-7 становила 6300 од. При аналізі концентрації 70 нг/мл інтенсивність фотолюмінесценції становила 5900 од. у сперміну та 5850 у спермідину. Порівнюючи з концентрацією 10000 кл/мл MCF-7 інтенсивність фотолюмінесценції становила 6000 од. При дослідженні 100 нг/мл поліамінів, інтенсивність люмінесценції становила 5800 од. у сперміну, 5700 од. у спермідину та 5900 од при дослідженні 100000 кл/мл MCF-7. Інтенсивність люмінесценції в суспензії клітин MCF-7 значно вища, навіть при порівнянні з мінімальною концентрацією поліамінів (10 нг/мл), навіть за умови малої кількості клітин у зразку (100 клітин). Однакова тенденція зберігається і при порівнянні кількості клітин з концентрацією як поліамінів, так і клітин MCF-7. Що свідчить про значне перевищення концентрації поліамінів у досліджуваній суспензії клітин MCF-7 (табл. 3.4).

Щодо відмінностей між інтенсивністю люмінесценції у розчинах самих поліамінів (сперміну та спермідину), то вони незначні, тому що останні схожі за молекулярною структурою. Дана методика дозволяє визначати поліаміни в низьких концентраціях клітин раку грудної залози, близько 100 кл/мл, яка зростає до 100000. клітин/мл. Мінімальна ж концентрація для виявлення поліамінів складає 10 нг/мл, максимальна 100 нг/мл (табл. 3.4). Узагальнюючи, можна спостерігати підвищену інтенсивність фотолюмінесценції клітин культури MCF-7 у порівнянні з модельними розчинами поліамінів, яка, однак, зменшується з кожною новою нанесеною кількістю клітин. Також порівнюючи інтенсивність фотолюмінесценції поліамінів між собою можна помітити вищу

інтенсивність фотолюмінесценції сперміну у порівнянні зі спермідином, що можливо пояснити більшою спорідненістю антитіл до даних поліамнів.

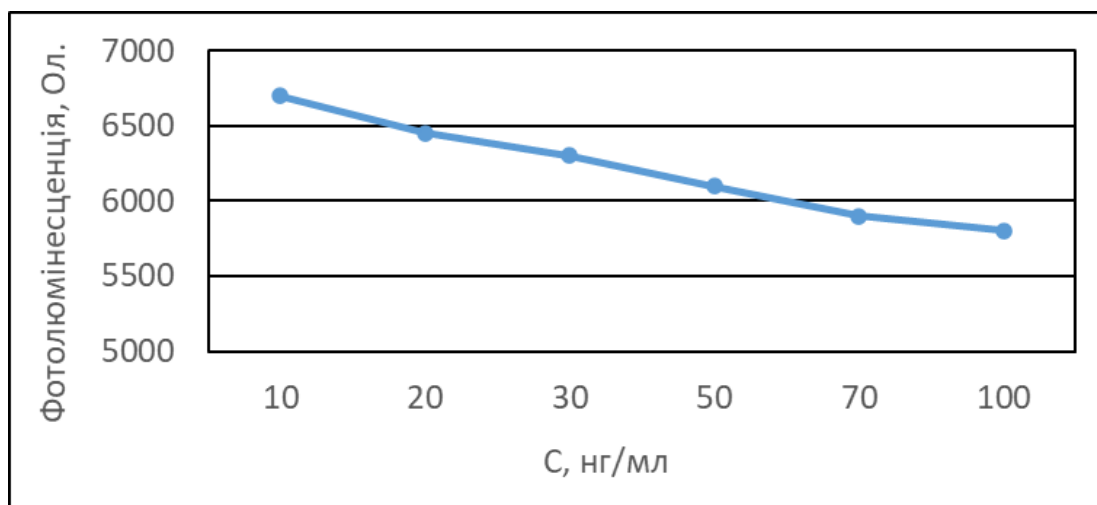


Рис. 3.12. Зміни фотолюмінесценції в залежності від концентрації сперміну в модельних розчинах.

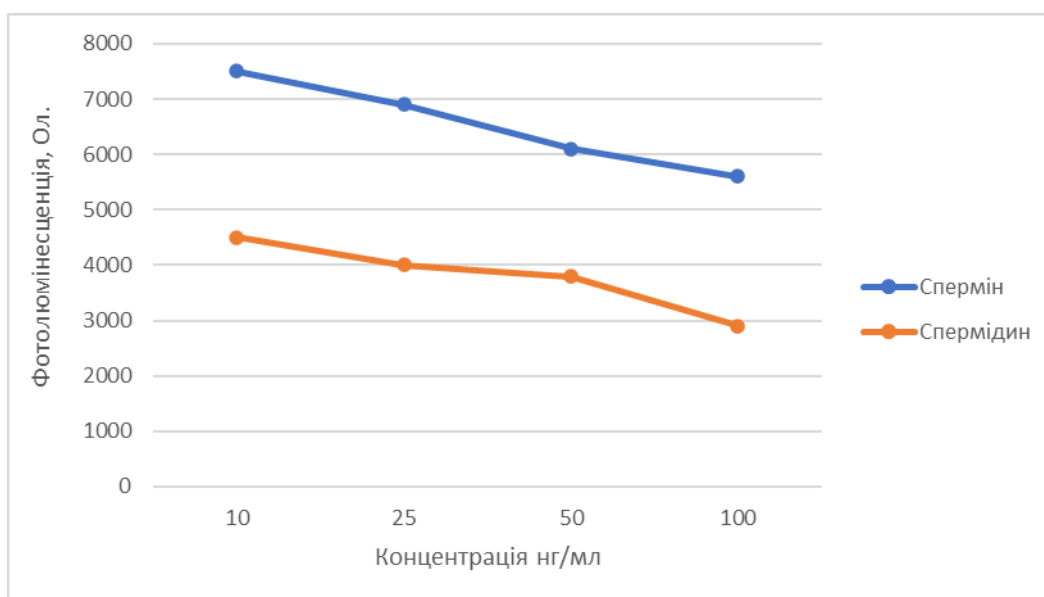


Рис. 3.13. Порівняння ефективності визначення поліамінів за допомогою біосенсора на основі наночастинок оксиду цинку.

Відмінності між інтенсивністю люмінесценції у розчинах поліамінів сперміну та спермідину незначні, тому що останні схожі за молекулярною структурою. Дана методика дозволяє визначати поліаміни в низьких концентраціях клітин раку грудної залози, близько 1×10^2 кл/мл, яка зростає до 1×10^5 клітин/мл. Мінімальна ж концентрація для виявлення поліамінів складає 10 нг/мл, максимальна 100 нг/мл (рис.3.12, рис. 3.13).

Інтенсивність люмінесценції в суспензії клітин MCF-7 значно вища, навіть при порівнянні з мінімальною концентрацією поліамінів (0,01мМ), навіть за умови малої кількості клітин у зразку (100 клітин). Однакова сама тенденція зберігається і при порівнянні кількості клітин з концентрацією як поліамінів, так і клітин MCF-7. Що свідчить про значне перевищення концентрації поліамінів у досліджуваній суспензії клітин MCF-7 (рис. 3.14).

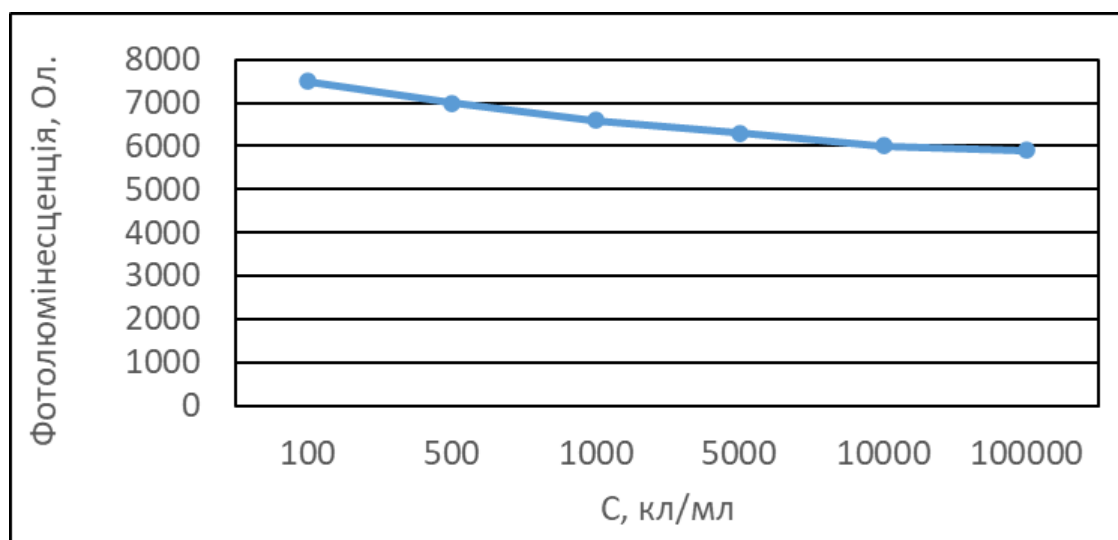


Рис. 3.14. Зміни фотолюмінесценції в залежності від концентрації клітин лінії MCF-7 в модельних розчинах.

3.7. Порівняння ефективності біосенсорів з перетворювачем на основі наночастинок ZnO та Au

В результаті проведених досліджень можна спостерігати що біосенсор, як на основі наночастинок ZnO так і золота здатний визначати, як поліаміни сперміну у розчині в різних концентраціях так і суспензії культурі клітин лінії раку грудної залози людини MCF-7. Сенсограми отриманих даних дозволяють спостерігати поступове збільшення концентрації сперміну, як в розчині так і в суспензії культури клітин. Можна спостерігати що діапазон чутливості визначений біосенсором знаходиться в межах від 5 до 1000 нг/мл для сперміну і від 100 до 100 000 кл/мл для суспензії клітин MCF-7 (рис. 3.15, рис. 3.16).

Аналіз отриманих даних дає можливість припустити, що малі концентрації сперміну краще визначається біосенсором, де в якості перетворювача сигналу використовується пластинка із золотим напиленням, у і знаходиться в діапазоні від $63,11 \pm 0,0043$ до $63,56 \pm 0,0049$ градусів що відповідає концентраціям від 5 до 100 нг/мл і чіткіше від відгуку при використанні пластинки з наночастинками ZnO у 1,04-1,10 разів. При концентрації від 500 до 1000 нг/мл можна спостерігати чіткіший відгук у біосенсора з пластинкою, обробленою наночастинками ZnO де відгук біосенсора знаходиться в межах від $64,50 \pm 0,0055$ до $67,10 \pm 0,0063$ і визначає наявність та концентрацію поліамінів у 1,5-2 рази чіткіше (рис. 3.17).

При аналізі ефективності визначення поліамінів у суспензії клітин MCF-7 дослідили, що, як і у випадку з попереднім дослідом біосенсор на основі золотої пластинки визначає наявність поліамінів краще в меншій кількості клітин в діапазоні від 100 до 500 кл/мл і знаходиться в діапазоні від $64,38 \pm 0,0050$ до $64,82 \pm 0,0057$, що більше у порівнянні з відгуком біосенсора на пластинці з наночастинками ZnO.

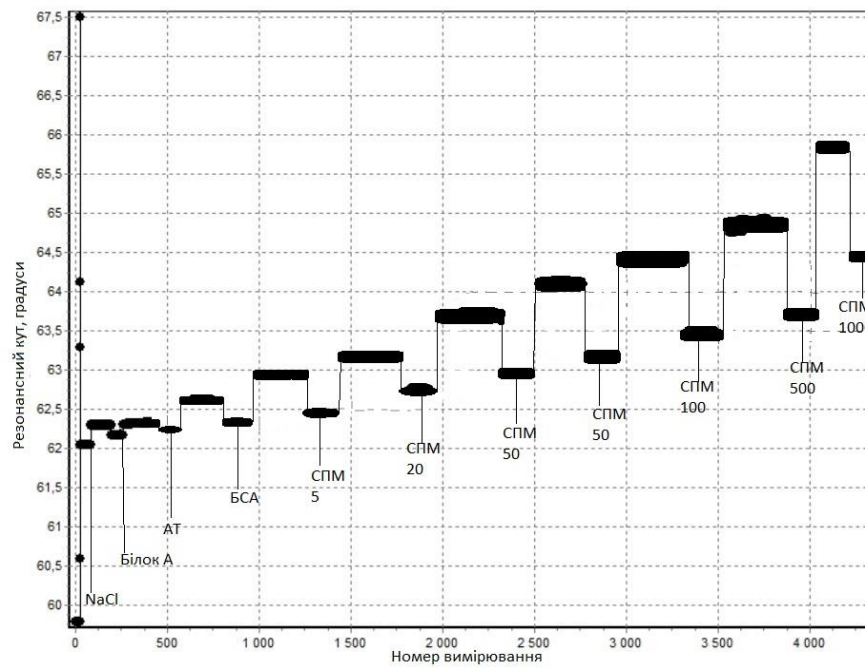


Рис.3.15. Сенсограма зсуву резонансного кута в залежності від концентрації сперміну

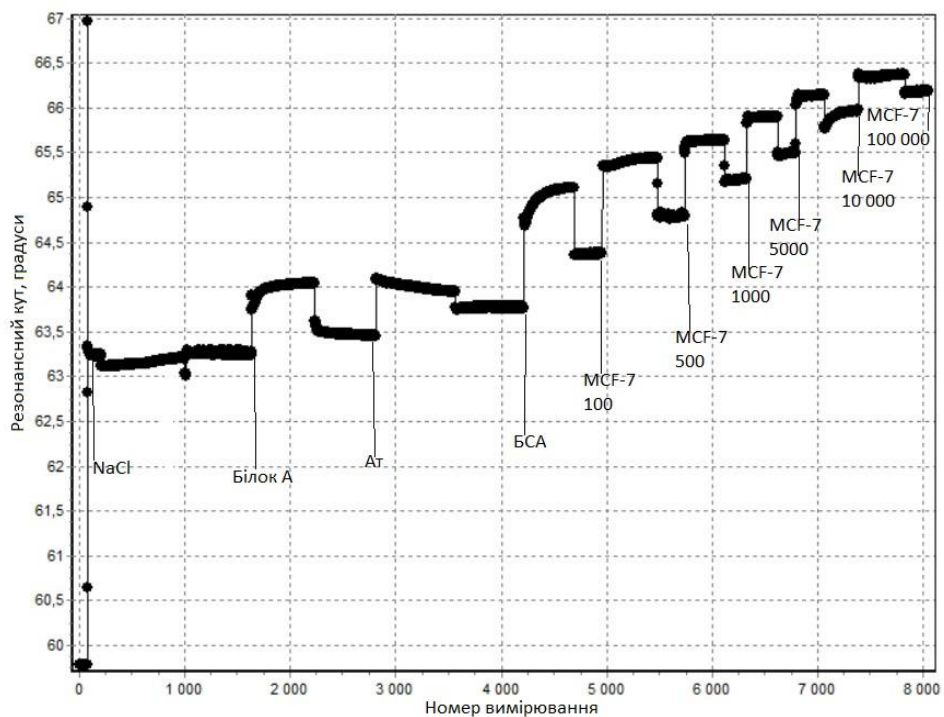


Рис.3.16. Сенсограма зсуву резонансного кута в залежності від концентрації клітин MCF-7

Надалі, при зростанні кількості клітин спостеріжали підвищення чіткості відгуку на пластинці з наночастинками ZnO в діапазоні концентрацій від 1000 до 100 000 кл/мл у 1,10-1,13 рази у порівнянні з біосенсором на пластинці покритій шаром золота. (Рис. 3.18). Зсув резонансного кута знаходиться в межах від $67,20 \pm 0,0069$ до $75,14 \pm 0,0078$.

Проаналізувавши отримані результати можна сказати, що обидва біосенсори показали достатню ефективність і здатні визначати наявність та концентрацію поліамінів як у розчині так і в суспензії клітин раку грудної залози MCF-7, однак, оскільки в лабораторній діагностиці першочерговим є виявлення патологічних процесів на ранніх етапах, і, як результат вчасно протидіяти захворюванню, тому рекомендованим є в подальшому застосування біосенсора з перетворювачем вкритим частинками золота, оскільки саме він здатен виявляти спермін краще в концентраціях від 5 до 100 нг/мл і в концентрації клітин MCF-7 від 100 до 500 кл/мл.

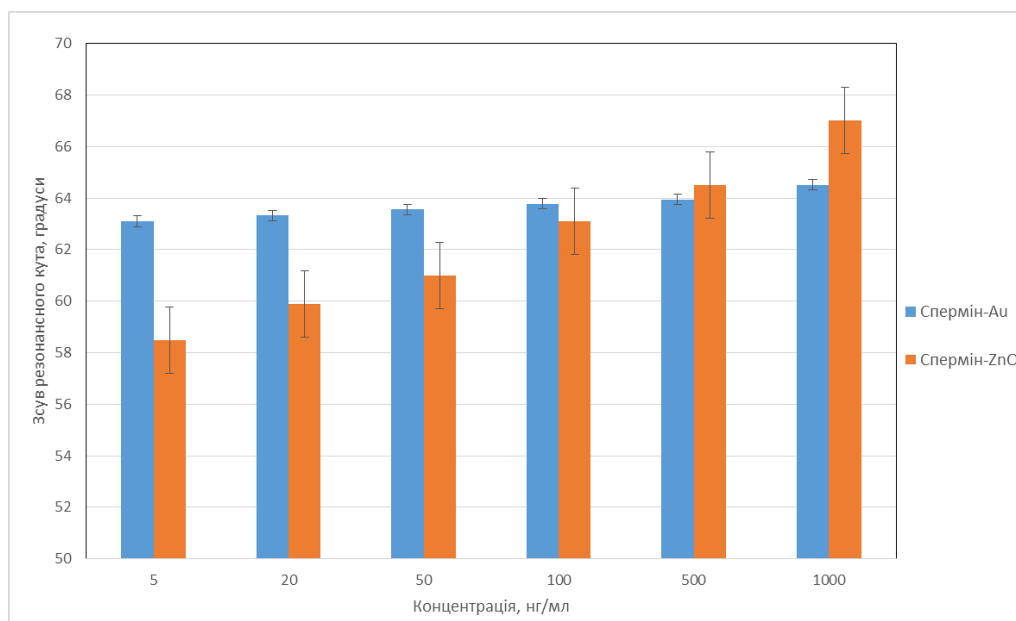


Рис 3.17. Порівняння ефективності визначення поліамінів біосенсорів на основі золота та наночастинок ZnO для визначення концентрації сперміну в розчині ($x \pm SD$, $p < 0,05$, $n = 6$).

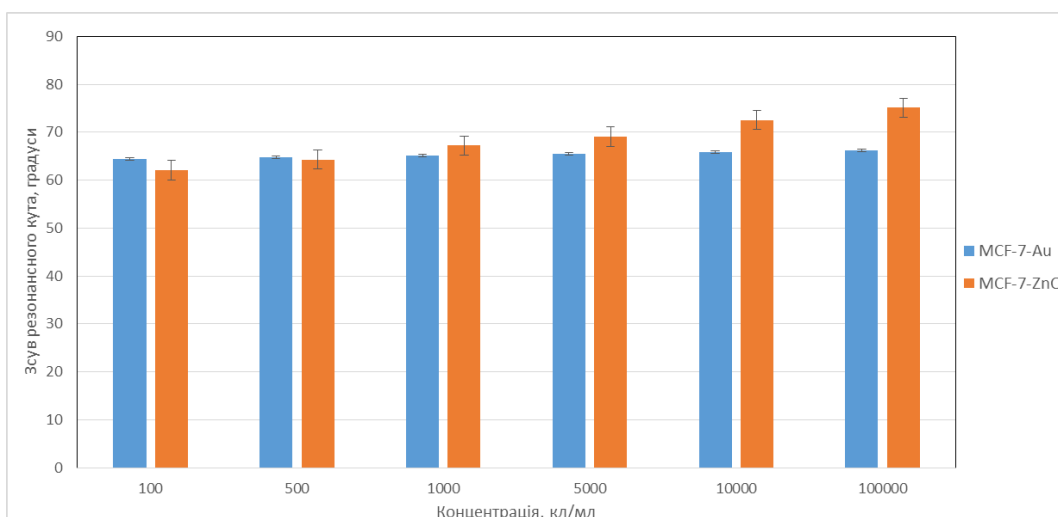


Рис. 3.18. Порівняння ефективності визначення поліамінів біосенсорами на основі золота та наночастинок ZnO ($x \pm SD$, $p < 0,05$, $n=6$)

3.8. Порівняння ефективності біосенсора на основі ППР та ZnO

Порівнюючи ефективність визначення поліамінів за допомогою різних типів біосенсорів було визначено, що якісніші результати були отримані за допомогою біосенсора на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу та трансдюсера покритого золотом. Однак, хоча біосенсор на основі ефекту фотолюмінесценції та трансдюсера покритого наночастинками цинку і показав гірші результати у порівнянні з біосенсором на основі ППР, особливо при визначенні вищих концентрацій поліамінів, при низьких концентраціях він також показав досить гарні результати.

При аналізі поліамінів за допомогою біосенсора на основі оксиду цинку було проаналізовано ряд концентрацій поліамінів для перевірки ефективності як низьких, так і високих концентрацій, але пріоритетом було визначити низькі концентрації, оскільки при діагностиці раку низькі концентрації матимуть високий пріоритет. Тому при визначенні концентрацій поліамінів біосенсором на основі оксиду цинку

спостерігалось поступове зменшення фотолюмінесценції. Ослаблення сигналу свідчить про поступове збільшення концентрації. Чіткіша реакція біосенсора спостерігалася при визначенні концентрації 100 нг/мл і становила 5600 фотолюмінесцентних одиниць для сперміну та 2900 для спермідину. Різниця між сперміном та спермідином коливалася від 2300 фотолюмінесцентних одиниць до 3000 фотолюмінесцентних одиниць. Різниця між зразками становила 500-800 фотолюмінесцентних одиниць у сперміні та 200-900 фотолюмінесцентних одиниць у спермідині.

Визначення поліамінів за допомогою поверхневого плазмонного резонансу виглядає ефективнішим, оскільки вони мають деякі корисні та ефективні властивості, такі як відсутність необхідності в деяких медіаторах або додаткових дорогих реагентах, поверхня трансдюсера може бути повторно використана після очищення поверхні. При визначенні поліамінів за допомогою біосенсора на основі ППР різниця між сперміном та спермідином коливалась від 0,11 при дослідженні концентрації поліамінів 25 нг/мл до 0,34 градусів при концентрації 100 нг/мл.

Таким чином було визначено, що біосенсор на основі ППР показав вищу ефективність у порівнянні з біосенсором на основі наночастинок ZnO на 14% при визначенні концентрації поліамінів у 10 нг/мл. При визначенні концентрації у 25 нг/мл, біосенсор на основі ППР виявився ефективнішим за біосенсор на основі наночастинок цинку на 19%, а при визначенні концентрації у 50 нг/мл, біосенсор на основі ППР виявився ефективнішим на 20%. При порівнянні ефективності біосенсорів у визначенні концентрації поліамінів у кількості 100 нг/мл, біосенсор на основі ППР виявився кращим у порівнянні з біосенсором на основі наночастинок ZnO на 30%. Порівнюючи отримані результати можна сказати, що біосенсор на основі ППР виявився ефективнішим за біосенсор на основі наночастинок ZnO, особливо при визначенні високих концентрацій поліамінів, що робить його більш ефективним у подальшому

використанні, однак біосенсор на основі наночастинок ZnO показав непогані результати при визначенні низьких концентрацій поліамінів у 10 та 25 нг/мл, що також може бути підставою для його подальшого використання, особливо при ранній діагностиці ракових захворювань (рис 3.19).

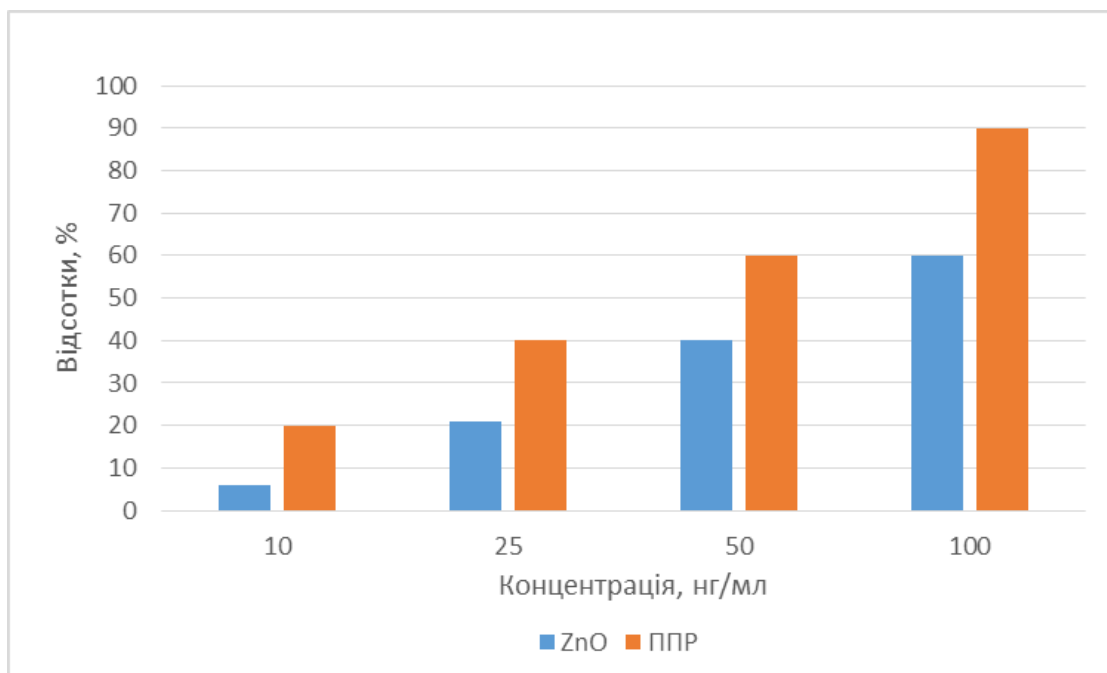


Рис. 3.19. Порівняння ефективності визначення поліамінів у модельних розчинах за допомогою біосенсорів на основі ППР та наночастинок ZnO.

3.9. Відпрацювання розробленої біосенсорної методики та визначення зсуву резонансного кута поліамінів у контрольних зразках сироватки крові.

Під час проведення досліджень було визначено, що зсув резонансного кута у пацієнтів, які не хворіють на рак грудної залози знаходяться в межах від 63 до 63,5 град. Всі дослідження були проведені на чутливій поверхні біосенсора. Чутлива поверхня біосенсора була модифікована додатковими речовинами такими, як білок А, отриманий зі

Staphylococcus aureus, для орієнтації сайтів зв'язування антитіл з досліджуваним зразком. Окрім того було нанесено шар специфічних антитіл для визначення аналітів, а також розчин поліамінів в якості контролю в концентрації. Зсув резонансного кута при підготовці поверхні знаходиться в межах від 62 до 62,9 градусів. При аналізі зразків сироватки крові здорових пацієнтів було визначено, що зсув резонансного кута біосенсора вищий у зразка №2 і становить 63,3 градуси у порівнянні з зразка №1, у якого зсув резонансного кута становив 63,1 градус. У зразка №3 зсув резонансного кута становив 63,5 градусів. Можна спостерігати. Що зсув резонансного кута поступово зміщується від 63,1 до 63,5, що може свідчити про підвищення концентрації поліамінів у досліджуваних зразках (рис. 3.20).

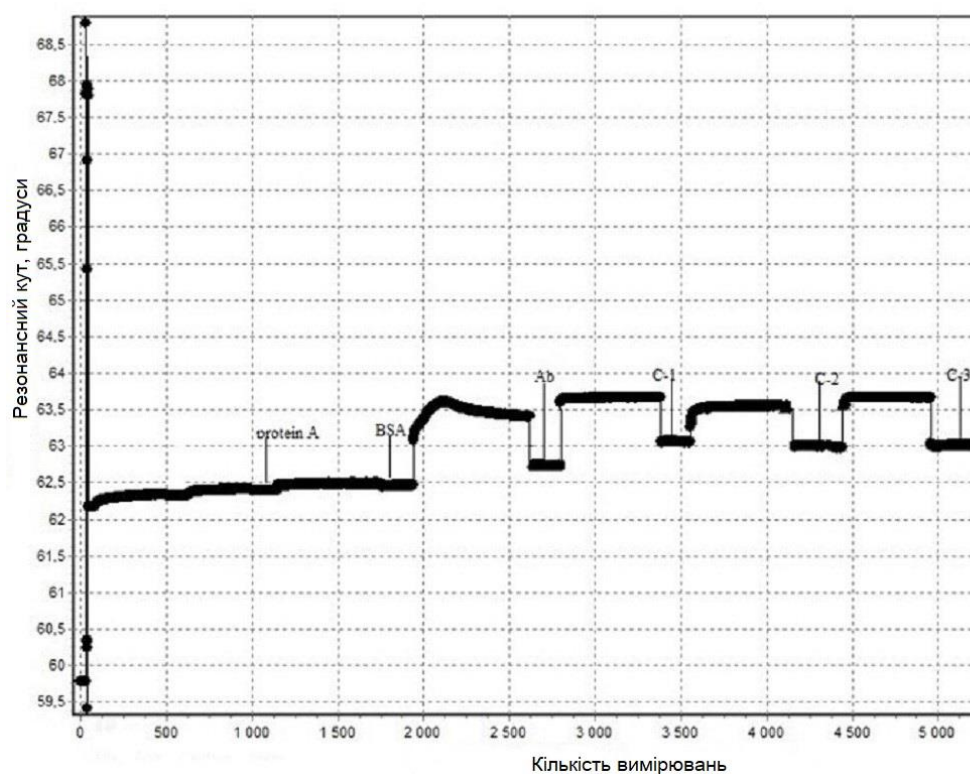


Рис. 3.20 Сенсограма відгуку біосенсора при різних концентраціях сперміну у зразках контрольної сироватки 1–3: BSA - бичачий сироватковий альбумін; Ab - антиспермінова сироватка; C-1, C-2 і C-3 - зразки сироватки крові контрольної групи.

У зразках сироватки крові здорових пацієнтів за номером 7, 8 та 9 також спостерігається поступове підвищення концентрації поліамінів від 63,2 до 63,6, що вище за зсув резонансного кута у попередніх зразках. Так, зсув резонансного кута зразка № 7 вищий за зсув резонансного кута при аналізі зразка №1 і становить 63,2 градуси проти 63,1. При порівнянні наступних зразків, можна спостерігати, що зсув зразка №8 вищий за №2 і складає 63,4 градусів проти 63,3. При порівнянні зразків №9 та №3 спостерігається більша зміна резонансного кута, яка складає 63,6 град. у порівнянні зі зразком №3 у якого зміна резонансного кута складає 63,5 град (рис. 3.21). Це дає можливість припустити про постпове збільшення концентрації поліамнів у контрольних зразках.

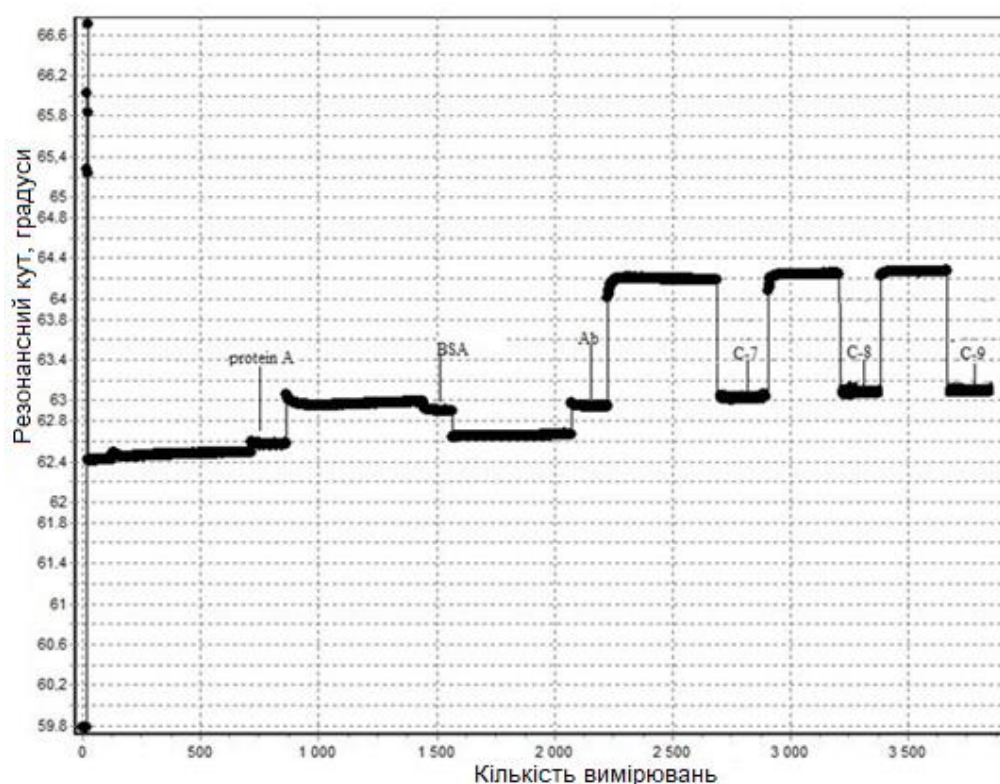


Рис. 3.21. Сенсограма відгуку біосенсора при різних концентраціях сперміну у зразках контрольної сироватки. C-7, C-8 і C-9 - зразки сироватки крові контрольної групи.

3.10. Визначення концентрації поліамінів у зразках сироватки крові хворих на рак грудної залози

Для визначення рівня поліамінів у сироватці крові хворих на рак грудної залози було використано попередньо створену калібрувальну криву (див. розд. 3.6.). В результаті проведених досліджень було проаналізовано 30 зразків сироватки крові. З них 9 було використано в якості контролю, оскільки вони були взяті у здорових людей. Інші зразки були отримані у пацієнтів, різних за віком, стадією захворювання та розміром пухлини. Зразки були люб'язно надані діагностичною лабораторією «Альфа-лабсервіс» (м. Харків, Україна).

Після створення калібрувальної кривої проводили аналіз зразків крові контрольних зразків. Встановлено, що зсув резонансного кута в цих сироватках не перевищував меж у 62,9–63,2 градуси (рис. 3.20, рис. 3.21). Як видно з калібрувальної кривої, ці значення корелюють з концентрацією сперміну від 5 до 10 нг/мл, які знаходяться у межах фізіологічних норм. В результаті проведених досліджень було визначено що концентрація поліамінів у зразках сироватки крові пацієнтів хворих на рак грудної залози знаходилася в межах від 20 до 100 нг/мл, що перевищує фізіологічні норми. Концентрація поліамінів у контрольній групі не перевищувала 7 нг/мл, тоді як концентрація поліамінів у II групі становила 21–27,2 нг/мл. У III групі концентрація поліамінів була в діапазоні 52,5–55,3 нг/мл (рис. 3.22).

Згідно з отриманими даними, зсув резонансного кута не тільки вищий у осіб з більшим розміром пухлини, але і у людей старшого віку. Хоча, як видно, істотні відмінності помітні тільки між групами II і IV. Це означає, що концентрація поліамінів залежить більше від розміру пухлини і стадії захворювання, а менше від віку пацієнта.

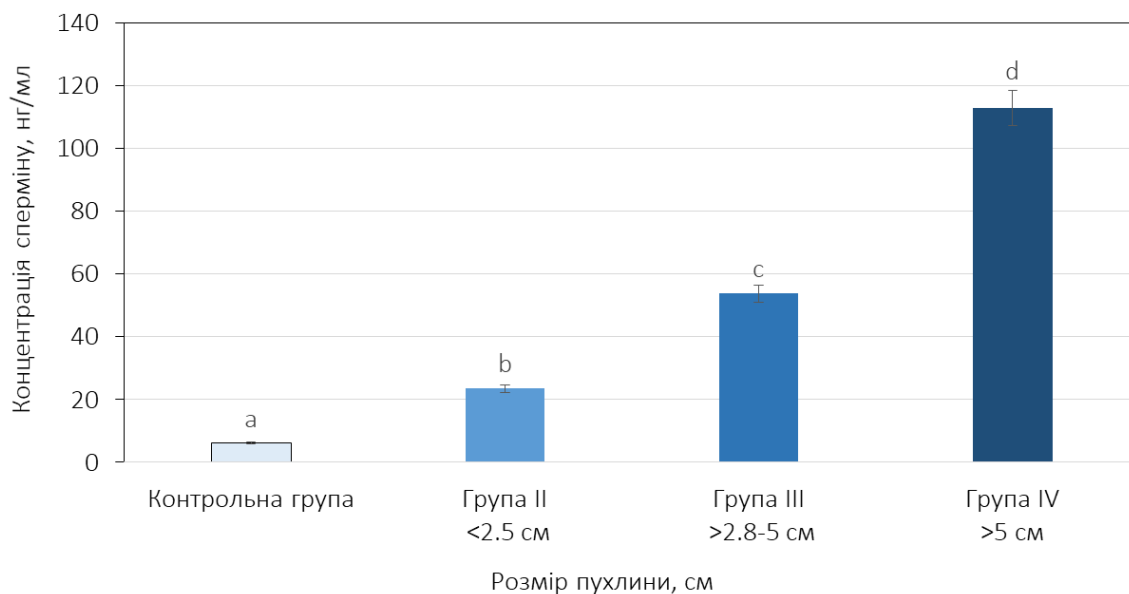


Рис. 3.22. Концентрація поліамінів у сироватці крові хворих на рак грудної залози залежно від розміру пухлини у 4 групах: різними літерами показано істотно значиму різницю значень між групами, визначену за допомогою тесту Тьюкі ($P < 0,05$) з поправкою Бонферроні. Контрольна група (a) - здорові особи ($x \pm SD$, $n = 9$), група II (b) - пацієнти з розміром пухлини менше 2,5 см ($x \pm SD$, $n = 7$), III група - пацієнти з розміром пухлини більше 2,8 см ($x \pm SD$, $n = 3$), IV група - пацієнти з розміром пухлини більше 5 см ($x \pm SD$, $n = 11$).

Згідно з отриманими даними, зсув резонансного кута не тільки вищий у осіб з більшим розміром пухлини, але і у людей старшого віку. Хоча, як видно, істотні відмінності помітні тільки між групами II і IV. Це означає, що концентрація поліамінів залежить більше від розміру пухлини і стадії захворювання, а менше від віку пацієнта (рис. 3.23).

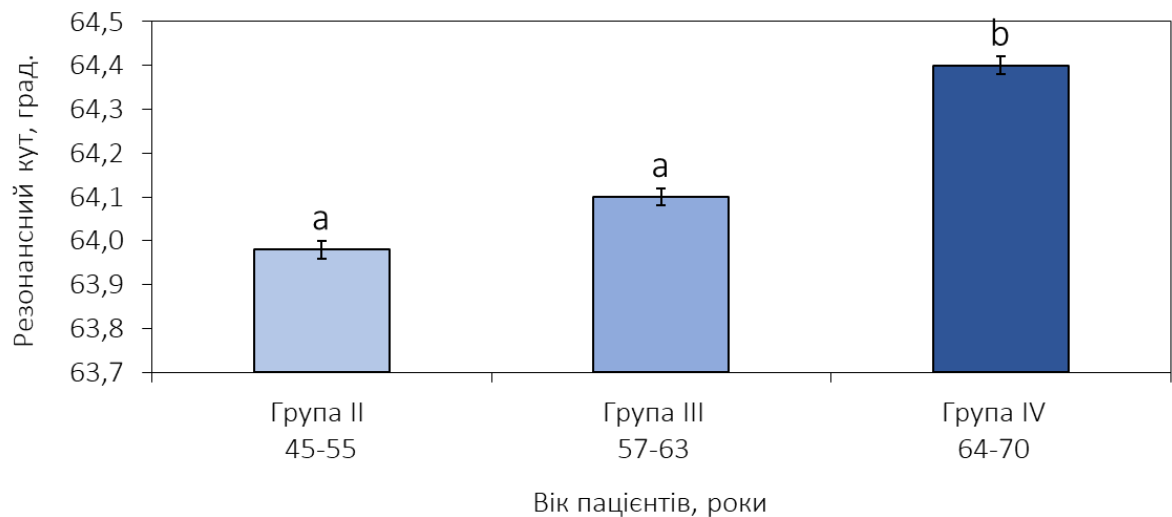


Рис. 3.23. Зміна резонансного кута при аналізі хворих різного віку: різні букви вказують на значення, які істотно відрізняються між групами. Пацієнти були поділені на групи, як і в попередньому експерименті, за винятком контролів. II група (a) - пацієнти у віці 45–55 років ($x \pm SD$, $n = 7$), група III (a) - пацієнти у віці 57–63 роки ($x \pm SD$, $n = 3$), група IV (b) - пацієнти у віці 64–70 роки ($x \pm SD$, $n = 11$).

3.11 Аналіз отриманих результатів

Зважаючи на отримані результати можна зробити наступні висновки. Оптичний біосенсор на основі поверхневого плазмонного резонансу здатний реєструвати такі поліаміни, як спермін і спермідин, в діапазоні концентрацій від 100 до 1000 нг/мл. Модифікація поверхні перетворювача такими речовинами, як БСА та білок А, дозволяє збільшити чутливість поверхні трансдюсера, зорієнтувати активні центри специфічних антитіл в сторону розчину та заблокувати неспецифічні місця зв'язування на поверхні перетворювача. Зміни резонансного кута при аналізі сперміну були дещо більшими, ніж у разі визначення спермідину, що очевидно обумовлено дещо різною просторовою структурою даних аналітів.

Щодо методики визначення рівня біогенних поліамінів в культурі клітин раку грудної залози, з використанням оптичних властивостей наночастинок цинку, то вона дозволяє створити підґрунтя для подальшого її впровадження у засоби високочутливої швидкої і точної діагностики раку грудної залози. Також дана методика не потребує великої кількості коштовних реактивів, що робить його більш економічним, ніж відомі аналоги. При цьому, потребується менше часу на підготовку і проведення самого аналізу, завдяки відсутності необхідності у деяких операціях.

Також було проведено аналіз зразків крові хворих на рак грудної залози. В результаті проведених досліджень було створено калібрувальну криву для подальшого визначення концентрацій поліамінів у зразках крові хворих на рак грудної залози. Було визначено, що рівень поліамінів корелює з розміром пухлини та віком пацієнтів, зразки сироватки крові яких було зібрано для аналізу. Таким чином було досліджено. Що концентрація поліамінів у пацієнтів хворих на рак варіює від 20 до 100 нг/мл, у порівнянні з контрольними зразками зібраними у здорових пацієнтів, у яких рівень поліамінів не перевищував 5-6 нг/мл. Окрім того було показано, що зсув резонансного кута біосенсора при порівнянні різних вікових груп, поступово зростає зі збільшенням віку пацієнтів, але й залежить від розміру пухлини, тому що зсув резонансного кута більший у пацієнтів з більшим розміром пухлини.

Це дає важливу можливість скоротити час на прийняття рішення про початок процесу розвитку злоякісної пухлини, і своєчасне призначення відповідної терапії.

Висновки до результатів дослідження

В процесі виконання досліджень було визначено, що найбільш ефективним алгоритмом аналізу виявився прямий - при якому антитіла іммобілізували безпосередньо на трансдюсерну поверхню. Також було визначено межі чутливості біосенсора, які виявилися досить широкими і

дозволили визначати поліаміни як у низьких так і у високих концентраціях. Окрім того було визначено, що модифікація трансдюсера відповідними речовинами дозволила покращити чутливість біосенсора.

Серед усіх досліджених поліамінів найкращу спорідненість з антитілами показав саме спермін, тому його було вирішено використовувати як основний у подальших дослідженнях. Окрім того було показано, що використання трансдюсера на основі наночастинок цинку виявилось доволі ефективним, а тому можливим є його використання і удосконалення у подальшому. При дослідженні сироватки крові пацієнтів різних вікових груп, хворих на рак грудної залози були визначені концентрації поліамінів, які дозволили визначити чи хворий пацієнт на рак грудної залози та на якій стадії захворювання пацієнт перебуває.

Основні наукові результати розділу опубліковано в працях автора [23-24, 87-90].

РОЗДІЛ 4

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Дане дослідження базується на попередніх дослідженнях Стародуба М. Ф. [95]. В даній роботі було описано створення імунобіосенсорної тестувальної платформи для експресного виявлення поліамінів у клітинах раку грудної залози. Виявлення і аналіз поліамінів проводився за допомогою спеціального приладу, який предствляв собою імунобіосенсор, який працює на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу, де реакція проходить в реальному часі на поверхні перетворювача, що закінчується формуванням імунних комплексів і записом зміни величини резонансного кута. Згідно з отриманими у даному дослідженні результатами, розроблений біосенсорний метод дозволяв знайти необхідні поліаміни в дуже низькій концентрації 10 нг в 100 мл. Більше того, кореляція чутливості біосенсора відповідно до концентрації поліамінів була в межах 10–100 нг/мл [87].

Згідно з іншим дослідженням, було показано, що зміни резонансного кута з'являються, як після модифікації поверхні перетворювача, так і після нанесення розчинів поліамінів. Під час процесу іммобілізації чутливого шару спостерігали незначну зміну резонансного кута. Наприклад, під час іммобілізації антитіл зміщення резонансного кута під час приготування чутливого шару було вище у сперміну (0,06 градусів), ніж у спермидину (0,05 градусів). Як показано, загалом, спорідненість до антитіл вище у сперміну, ніж у спермидину. Також було виявлено, що зі збільшенням концентрації поліамінів зміщення резонансного кута зростає. В ході дослідження отримані дані показали зміщення резонансного кута, як після модифікації поверхні перетворювача, так і після нанесення розчинів поліамінів. Ця тенденція спостерігається як у дослідженні сперміну, так і спермидину. Під час процесу іммобілізації чутливого шару спостерігалася

невелика зміна резонансного кута. Через наявність перехресної реактивності та меншої діагностичної значущості спермідину в нашому дослідженні ми проаналізували спермін [88].

У іншому дослідженні, яке стосувалося використання біосенсора поверхневого плазмонного резонансу в діагностиці раку грудної залози, повідомлялося про можливість аналізу біомаркеру раку грудної залози ErbB2. Проведено оптимізацію аналізу з підвищенням сигналу, за допомогою нанесення наночастинок золота. Досліджено ефект нанесення наночастинок золота. Автори провели клінічні випробування. Результати показали, що в 50% зразків сироватка крові містила 180 пг/мл поліамінів, що у 83 рази нижче порівняно з клінічними випробуваннями. Також були оцінені лізати, отримані з клітин раку грудної залози різних ліній (SK-BR-3, MCF-7 і MDA-MB-436). Високі кількості білка ErbB2 спостерігалися у випадку надекспресії в клітинній лінії SK-BR-3. Проведені експерименти довели високу ефективність ППР біосенсора [61].

Було також проведено дослідження, присвячене виявленню біомаркерів у рідинах організму та деяких тканинах за допомогою біосенсорів на основі поверхневого плазмонного резонансу та електроаналітичних біосенсорів. Останнім часом спостерігається великий вплив пристосування нових діагностичних методів до своєчасного виявлення онкологічних захворювань. Наведені дослідження показують деякі останні розробки, які стосуються техніки поверхневого плазмонного резонансу, яка була модифікована для оцінки біомаркерів раку грудної залози та хвороби Альцгеймера. У порівнянні з хворобою Альцгеймера, рак грудної залози виявився складним захворюванням і потребував ефективнішої діагностики. Порівняно з раком грудної залози, хвороба Альцгеймера є неврологічним розладом, який пов'язаний з кількома біомаркерами. У біосенсорів на основі ППР виявилось багато ефективних властивостей, таких як мобільність, чутливість і комплексне виявлення

декількох різних зразків [100]. У нашому дослідженні ми також використовували біосенсор на основі ППР і рак грудної залози як цільове захворювання.

Stojanović та ін. вивчали потенційні можливості візуалізації за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPRi), при аналізі апоптотичних злоякісних клітин, вимірювання екскреції цитохрому С. Деякі місця на поверхні біосенсора ППР були покриті спеціальними антитілами проти цитохрому С, ЕpCAM та CD49e. Клітини MCF-7 іммобілізували на поверхні перетворювача і поміщали в культуральне середовище, яке включає паклітаксель. Були помічені специфічні зміни відгуку біосенсора SPRi на місцях, покритих антитілами ЕpCAM, що вказувало на зв'язування з клітинами MCF-7 і залежність відгуку біосенсора від присутності лікарського засобу на місцях, покритих, як антитілами до ЕpCAM, так і антитілами до цитохрому С. Дослідники зробили припущення про підвищення рівнів цитохрому С у клітинах MCF-7. Також, отримані результати представляють SPRi як специфічний метод оцінки чутливості ракових клітин на лікарські засоби або комбінації лікарських засобів у режимі реального часу [95]. У нашому дослідженні для поліпшення аналітичної поверхні ми покривали поверхню перетворювача білком А для кращої орієнтації антитіл і БСА для блокування неспецифічних ділянок.

Monteiro та ін. вивчали можливість використання біосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу для оцінки пухлинних маркерів. Проте у традиційній методиці ППР було виявлено певні труднощі у процесі експерименту. Які були усунені за допомогою використання перетворювачів на основі нанопор, побудованих на металевих плівках. Конфігурація масивів нанопор демонструвала появу специфічного оптичного явища. Це явище було використано при спостереженні процесів зв'язування, які відбуваються на поверхні

металевого перетворювача. Автори створили плазмонний біосенсор, заснований на використанні нанопорового перетворювача, створеного на металевій плівці. Створений біосенсор міг виявляти антиген епідепмального рецепторного білка людини-2 (HER2) в концентрації 30 нг/мл. [81]. У нашому дослідженні ми також використовували покритий золотою плівкою перетворювач, але в якості мішені використовували поліаміни сперміну у сироватці крові пацієнтів хворих на рак грудної залози.

Kingsnorth та ін. обстежили 54 пацієнта із середнім віком 59,2 років (діапазон 25–82 років). Пацієнтів спостерігали протягом 2 років (діапазон 24-58 місяців, у середньому 34,1 місяця). Одинадцять жінок перебували у менопаузі. Розмір пухлини оцінювали клінічно відповідно до класифікації UICC. Пацієнтів з пухлинами T4 (n = 10) або з фіксованими гомолатеральними пахвовими вузлами або зі злоякісними гомолатеральними надключичними вузлами (N) лікували комбінацією місцевої та системної терапії.

Поліаміни, такі як спермін, спермидин і путресцин, екстрагували і розділяли. Потім їх зміст виражали в нг. Рівні поліамінів пацієнтів хворих на рак грудної залози (n = 54) вимірювали як додатковий прогностичний маркер. Були визначені концентрації поліамінів (виражені у нг), які знаходилися у діапазоні 0,9–4,5 нг для путресцину, 4,2–29,8 нг для спермідину та 5,6–39,7 нг для сперміну. Спостерігалася кореляція між підвищеними рівнями внутрішньоклітинних поліамінів і факторами, які впливають на виживання після мастектомії, і негативний статус естроген-рецепторів. Збільшені пухлини T4 і карциноми медулярного типу також містили високі рівні поліамінів. Властивості пухлин не впливають на рівні поліамінів у новостворених пухлинах. Дворічна пухлина мала вищі рівні поліамінів, порівняно з новоствореними. Концентрацію поліамінів визначили як біологічний маркер агресивності пухлини яка може бути

використана як прогностичний показник раннього рецидиву пухлини, який не залежить від стану вузла. Порівнюючи з автором представлених даних, ми обстежили 30 пацієнтів, відмінних за віком та концентрацією поліамінів. Концентрація сперміну була в межах 5–120 нг/мл сироватки крові [73].

Інше дослідження показує можливість виявлення поліамінів у слині людини за допомогою високоефективної рідинної хроматографії. У цьому дослідженні вісім поліамінів, таких як спермін (SPM), кадаверин (CAD) ацетилспермін (Ac-SPM), N¹-ацетилспермідин (N¹-Ac-SPD) і N⁸-ацетилспермідин (N⁸-Ac-SPD). Кореляція рівня поліамінів у хворих на рак грудної залози та здорових осіб склала 88% та 76% на попередніх тестах відповідно, тоді як кореляція рівня поліамінів тих, хто перебував на валідації, становила близько 88%. Автори визначали вищезгадані поліаміни у слині після виконання операції для оцінки зміни концентрації поліамінів до і після лікування. Специфічність і чутливість показали майже 80% від результатів аналізу [97]. У нашому дослідженні ми проаналізували тільки сироватку пацієнтів, якої було достатньо для визначення концентрації сперміну. На відміну від проведених досліджень ми визначали вільні, але не ацетильовані форми поліамінів.

Balcerzak та ін., вивчали ефективність виявлення поліамінів за допомогою рідинно-мембранної технології, пов'язаної з високоефективною рідинною хроматографією (VERX), яка виявилася відповідною методикою для аналізу концентрації поліамінів у рідинах людського тіла. В якості додаткового методу використовували визначення поліамінів в тканинах і рідинах організму людини. Пошук нових методів діагностики дуже важливий. Оцінка рівня поліамінів може стати цим новим методом. Попередні дослідження показали, що розроблена технологія визначення поліамінів може бути застосована як додатковий діагностичний засіб [40]. Хоча автор цього дослідження використовував VERX як діагностичний

інструмент, ми використовували біосенсор на основі ППР і визначили, що поліаміни можуть бути використані, як маркер у аналізі раку грудної залози.

Інші дослідження були зосереджені на оцінці поліамінів у крові, сечі та тканинах. У раковій тканині рівні поліамінів були значно вищими, порівнюючи їх рівень у контролі та у хворих. Концентрації поліамінів визначали за допомогою гістологічної оцінки та індексу Ki-67 [77]. За даними автора, вміст поліамінів у крові здорових людей становить 10,1 нг/мл (діапазон 8–12,5). Середнє значення для сперміну становить 4 нг/мл (діапазон 3–5 мг/мл). Виявлено, що концентрація поліамінів у сироватці крові здорових людей була в межах 5–10 нг/мл, що корелює з даними наведеної статті.

Згідно з дослідженнями Вуип та ін., за допомогою ВЕРХ визначали концентрації поліамінів у сечі та сироватці крові, отримані від 30 пацієнтів з раком грудної залози, які порівняли з 30 нормальними контролями. Отримані результати показали, що рівні поліамінів у тканинах, сечі та сироватці пацієнтів були значно вищими, ніж у нормальних тканинах, сечі та сироватці крові. Для порівняння, рівні поліамінів у хворих на рак грудної залози були вищими тільки в тканинах, і не було суттєвої різниці у сечі між пацієнтами з раком грудної залози і контролем. Результати аналізу поліамінів у сечі корелюють з попередніми дослідженнями. Концентрації поліамінів виявлені при дослідженні раку грудної залози були меншими у порівнянні з тканинами передміхурової залози і товстої кишки. Таким чином, у випадку раку грудної залози рівень поліамінів у сечі не виявився надійним пухлинним маркером в діагностиці або прогнозі, на відміну від інших видів раку. У сироватці крові, рівень 1,3-діамінопропану, путресцину, сперміну і N-ацетильованого спермідину значно збільшився у хворих на рак грудної залози. Ці результати добре узгоджуються з попередніми повідомленнями про те, що сироваткові концентрації

путресцину і сперміну у хворих на рак грудної залози були вищими, ніж у контрольних. У цьому дослідженні рівень сироваткового вмісту N-ацетильованого спермідину був також вищим у хворих на рак грудної залози. З отриманих результатів щодо рівнів 1,3-діамінопропану, путресцину, сперміну і N-ацетильованого спермідину у сироватці можна сказати, що поліаміни можуть бути потужними діагностичними біомаркерами раку грудної залози [42]. Результати наших досліджень також показують, що у разі раку грудної залози рівень поліамінів (у нашому випадку це спермін) значно вищий порівняно зі здоровими контролями.

Інші дослідження були присвячені аналізу рівнів сироваткових поліамінів у хворих на рак грудної залози, у період до менопаузи, які були класифіковані як перед- і післяопераційні, і були проаналізовані. Були проаналізовані концентрації поліамінів у сироватці 58 хворих на рак грудної залози і 45 здорових осіб до менопаузи. Більшість рівнів поліамінів була вищою у пацієнтів з раком грудної залози перед менопаузою, ніж у контрольних, крім кадаверину і N¹-ацетилсперміну. Всі рівні поліамінів були дещо знижені лише у післяопераційних пацієнтів, але не у контрольних. Було проведено статистичний аналіз рівня значущості між до- і післяопераційним періодом, і відмінності не були суттєвими. Результати показали, що кількість 1,3-діамінопропану, N-ацетилпутресцину, N-ацетилспермідину і сперміну була вищою у пацієнтів до операції порівняно з контролями. Рівні N-ацетилпутресцину ($P < 0,0005$) і сперміну ($P < 0,005$) були значно підвищені. Також були оцінені сироваткові рівні поліамінів у 18 хворих після менопаузи і 11 здорових осіб відповідного віку. Ці пацієнти, хворі на рак грудної залози також були класифіковані як до- і післяопераційні. На відміну від даних про пацієнтів до менопаузи, 1,3-діамінопропан, путресцин, кадаверин і N-ацетилпутресцин були вищими у пацієнтів після менопаузи, порівняно з контролем. Рівні N-ацетилкардеверину, спермідину, N-ацетилспермідину,

сперміну і N¹-ацетилсперміну були вищими у контролі порівняно з пацієнтами після менопаузи.

Отримані дані показали, що підвищені рівні поліамінів у хворих на рак грудної залози до менопаузи повертаються до рівнів контролю після операції. Більш того, хворі, які не приймали ніяких гормонів під час експерименту, дають можливість припустити, що ці результати можуть не впливати на рівні екзогенних естрогенів. Автори порівнювали обидва типи хворих після і до менопаузи з контролем. Визначені сироваткові поліаміни були вищими у пацієнтів з раком грудної залози до менопаузи, тоді як у пацієнтів після менопаузи були подібні до контрольних. Також спостерігалось незначне зменшення поліамінів у пацієнтів після операції [43]. Хоча в нашому дослідженні ми не були зосереджувалися на вивченні пацієнтів до і після менопаузи, однак ми вивчали післяопераційних пацієнтів.

Згідно з дослідженнями, зробленими Persson і Rosengren, кількість N¹-ацетилспермідину була вищою у пухлині порівняно з невеликою кількістю N¹-ацетилспермідину, що міститься в нормальних тканинах грудної залози. N¹-ацетилсперміну, не було знайдено у нормальній тканині грудної залози, і ні пухлина, ні нормальна тканина грудної залози не містили жодної виявленої кількості N⁸-ацетилспермідину. Кількість вільних поліамінів також була значно вищою у пухлинній тканині, порівняно з нормальною тканиною грудної залози. Спостерігалися підвищені рівні N¹-ацетилспермідину і N¹-ацетилсперміну, який може бути приступним у пухлині внаслідок підвищеного синтезу або зниженого катаболізму. Ацетилспермідин може бути продукований ядерною ацетилтрансферазою, яка також діє на ряд інших субстратів, включаючи гістони. Хоча, коли спермідин використовується в якості субстрату, основним продуктом цього ферменту є N¹-ацетилспермідин, а не N¹-ацетилспермін. Натомість, формування N¹-ацетилспермідину виконується

цитозольним ферментом, а саме спермідин/спермін N¹-ацетилтрансферазою, яка виробляє виключно N¹-ізомер. Цей фермент дуже індукцибельний за рахунок різних факторів. Що стосується катаболізму, то і N¹-ацетилспермідин і N¹-ацетилспермін окислювально розкладаються поліаміноксидазою. Активність цього ферменту значно перевищує активність спермідин/спермін N¹-ацетилтрансфери, що робить ацетилювання поліамінів лімітуючим кроком.

За отриманими даними, ацетилююча активність спермідину була значно вищою у пухлині з наявністю N¹-ацетилспермідину і N¹-ацетилсперміну, ніж у нормальній тканині грудної залози. Нижній рівень спермідин/спермін N¹-ацетилтрансфери виявився дуже низьким у різних тканинах, і більша частина ацетилюючої активності, як видається, здійснюється іншими ферментами. Отже, фактичне збільшення спермідин/спермін N¹-ацетилтрансферазної активності часто недооцінюють. Для того, щоб встановити, чи спостерігалось збільшення ацетилюючої активності спермідин/спермін N¹-ацетилтрансфери в тканині пухлини аналізували ацетильовані продукти сперміну та спермідину. Вивчено, що велика частка синтезованого ацетилспермідину виділяється у вигляді N¹-ацетилспермідину при екстракції з тканини раку грудної залози. Однак, також, була синтезована велика кількість N¹-ацетилспермідину вказуючи на те, що не вся ацетилююча активність була обумовлена індукцибельною спермідин/спермін N¹-ацетилтрансферазою. Порівнюючи, тільки N⁸-ацетилспермідин утворювався у скільки-небудь значних кількостях у екстрактах нормальної тканини грудної залози. Говорячи про те, що деякі пухлини мають схильність до утворення підвищених рівнів ацетильованих поліамінів, дуже цікавим виглядає визначення того, чи можуть ці кон'югати бути маркерами пухлинного росту [84]. У нашому дослідженні ми використовували не N¹-ацетилспермін, а вільний спермін, який міститься у сироватці крові. Наші

результати також показали підвищення рівня поліамінів при наявності пухлини.

Інше дослідження було проведено для аналізу рівня поліамінів при раку передміхурової залози і грудної залози. Для визначення концентрації поліамінів у плазмі крові використовували радіоімуноаналіз. Дослідження чутливості склали 1 нг сперміну на 100 мл плазми, а рівень перехресної реактивності становив близько 12% для спермідину і 0,18% для путресцину. Концентрацію сперміну в плазмі, при раку передміхурової залози, вимірювали за допомогою радіоімуноаналізу. Було відзначено, що концентрації лише іноді підвищувалися у пацієнтів з пухлинами передміхурової залози порівняно зі здоровими особами ($0,21 \pm 0,14$ нг/мл). Виявлено 17% пацієнтів з високою концентрацією поліамінів у разі раку грудної залози. Не було виявлено кореляції між високою концентрацією поліамінів і класом пухлини або наявністю метастазів. Порівнюючи з даними радіоімунологічного аналізу, біосенсорний аналіз також може виявляти поліаміни в наноконцентраціях [45]. Ми не потребували додаткових міток, як це було в радіоімуноаналізі, і ми уникали крос-реактивності, оскільки не використовували інші поліаміни, крім сперміну.

В іншому дослідженні були порівняні рівні поліамінів та інших 24 загальних пухлинних маркерів, які застосовуються у клінічній практиці. Дані були отримані шляхом визначення концентрацій кожного пухлинного маркера пацієнтів. Спостерігалось, що путресцин (77,71%) є більш специфічним маркером, ніж спермідин (59,50%). Хоча специфічність путресцину (77,92%) була найнижчою. З іншого боку, спермін мав порівняно чудову специфічність (92,86%), хоча чутливість (27,33%) не відповідала очікуванням. Автори відсортували 27 пухлинних маркерів відповідно до середніх значень. За отриманими даними поліаміни, особливо путресцин і спермідин, набагато випереджали решту пухлинних маркерів. Ці дані були корисними для клініцистів для вибору відповідних

маркерів у діагностиці раку. Також було порівняно значення сперміну, спермідину і путресцину як пухлинних маркерів у 11 видів раку. У випадку сперміну, негативна прогностична цінність (94,08%) і загальна ефективність при (87,95%) раку підшлункової залози були найвищими у 11 видів раку. Спочатку визначили позитивну прогностичну цінність раку грудної залози. У загальному, оцінюючи ракові захворювання, спермін виявився набагато придатнішим для діагностики раку яєчників через його високу чутливість (48,00%) і середнє значення (74,26%). У випадку спермідину, негативна прогностична цінність (99,23%) і чутливість (94,44%) при діагностиці раку глотки були кращими з усіх видів раку. Спермідин виявився придатним для застосування при раку стравоходу і раку глотки. Щодо путресцину, то негативне прогностичне значення і чутливість були настільки чудовими, що вони досягли 100%, але середнє значення було четвертим серед 11 видів раку. Рак стравоходу був першим із середнім значенням до 81,92%. Також було визначено середні значення 27 пухлинних маркерів у 11 видів раку відповідно. Було порівняно середні значення між поліамінами і лідуєчим маркером у кожному виді раку. Лідуєчим маркером був той, чий середній показник був найвищим у порівнянні з іншими 26 пухлинними маркерами в одному і тому ж виді раку. Хоча спермідин і путресцин адекватно відображали значення при раку стравоходу порівняно з іншими видами раку, спермідин (83,08%) мав більш високе середнє значення, ніж путресцин (81,92%). Середні значення путресцину вищими, ніж у спермідину, і сперміну у більшості видів раку [63].

У нашому дослідженні ми також використовували спермін через високоспецифічні властивості, як показали наші попередні дослідження.

В іншому дослідженні використовували метод рідинної хроматографії для аналізу поліамінів у сечі та їх ацетильованих метаболітів, який виявився ефективним для кількісного визначення принаймні дев'яти

поліамінів, таких як путресцин (PUT), спермідин (SPD), спермін (SPM), ацетилпутресцин (AcPUT), ацетилкадаверин (AcCAD), N¹-ацетилспермідин (N¹AcSPD), N⁸-ацетилспермідин (N⁸AcSPD), діацетилспермідин (DiAcSPD) і діацетилспермін (DiAcSPM), отриманих зі зразків сечі людини, і трьох поліамінів (діамінопропан, кадаверин, ацетилспермін) які можуть бути кількісно визначені, якщо концентрація в зразках є досить високою. Крім того, ще два нейтральні, ацетильовані діаміни можна аналізувати напівкількісно. Паралельний аналіз цих 14 поліамінів проводили без будь-якої дериватизації у підготовці зразків з використанням колонок твердофазної екстракції і мічених дейтерієм внутрішніх контролів для кожного зразка. Метод виявився придатним для кількісного визначення [71]. Порівнюючи з представленими даними, ми використовували біосенсор на основі ППР і створювали калібрувальну криву концентрацій сперміну. Визначення концентрації цього поліаміну дозволило кількісно оцінити рівень поліамінів у сироватці крові.

Інше дослідження показало оцінку концентрацій путресцину і кадаверину, в слині здорових осіб після пробудження і протягом доби. Автори виявили, що путресцин був найпоширенішим в порівнянні з кадаверином. Після пробудження концентрація поліамінів була найвищою (путресцин – 33 мг/мл, кадаверин – 17 мг/мл) зі зниженням протягом доби (путресцин – 7 мг/мл, кадаверин – 3 мг/мл). Авторами розроблено новий аналітичний метод на основі високоефективної рідинної хроматографії та флуоресцентної детекції для оцінки амінів у слині людини. Показано, що фторид натрію є ефективним інгібітором утворення амінів в слині при кімнатній температурі, що дозволяє збирати зразки і зберігати не на холоді [55]. У порівнянні з наведеними дослідженнями наші дані дають можливість визначити концентрацію поліамінів у сироватці крові в наноконцентраціях, що робить наш метод більш ефективним порівняно з даними представлених авторів.

У дослідженні, описаному Fujiwara, імунологічний аналіз був використаний для аналізу поліамінів з використанням міченого бета-галактозидазою сперміну, і антисироватки, отриманої від кроликів проти ко'югату спермін-БСА. Специфічність анти-спермінової сироватки визначали шляхом вимірювання зміщення сперміну зв'язаного з галактозидазою (Spm-fl-Gal) за допомогою путресцину, спермідину і сполук схожої структури. Були побудовані калібрувальні криві, що показують взаємозв'язок між концентраціями не мічених сполук і відсоток зв'язаної спермін-галактозидази. Були вивчені експериментальні умови для імунологічного аналізу, і було виявлено, що 0,1% розчин антисироватки, отриманий через 6 тижнів після початкової імунізації 5% розчином Spm-fl-Gal, 8 год інкубаційного періоду антисироватки з Spm-fl -Gal (в присутності або відсутності не міченого сперміну), і ще 3 год інкубаційного періоду з іншим антитілом забезпечували ефективну систему аналізу при 25 ° С. Розведена антисироватка зв'язувала 55–60% доданого Spm-fl-Gal в контрольних пробірках, що не містять міченого поліаміну, і зробила можливим чутливий аналіз на спермін або спермідин. Чутливість обох аналізів, визначена як найменша кількість, що відрізняється від нуля на 95% довірчому рівні, становила 1 нг на пробірку, а робочий діапазон становив від 1 нг до 50 нг для кожного з поліамінів. Відтворюваність аналізу проводили протягом доби (інтрааналіз) і протягом періоду в 1 тиждень (інтераналіз). Коефіцієнти варіації для інтра- і інтераналізів при 5 різних рівнях сперміну у кожній варіації становили 7,4–18,1% та 9,7–27,1% відповідно. В експериментах по відновленню використовували 5 нормальних сироваток людини, що містять 57,1–65,0 нг ендogenous поліаміну на мл. Кожен зразок сироватки оцінювали з додаванням і без додавання сперміну (5 нг, 10 нг, 20 нг, 40 нг), і розраховували відновлення доданого сперміну з використанням стандартної кривої. Як було показано, аналітичні відновлення становили

від 105 до 115%. Найнижча концентрація, яка була виявлена при використанні методу, становила 1 нг сперміну на тестову пробірку. Сироватка, що використовувалася в аналізі, піддається 88% перехресної реактивності до спермідину. Істотної перехресної реакції порівняно з путресцином, діамінопропаном і кадаверином не відбулося. Авторами розроблено цей метод для оцінки сироваткових рівнів поліамінів у здорових осіб і хворих на рак [64]. У нашому дослідженні ми аналізували вільні поліаміни без будь-яких додаткових міток порівняно з дослідженнями, представленими в статті Fujiwara. Під час експерименту спостерігали підвищення рівня вільного сперміну в діапазоні від 5 до 100 нг/мл сироватки крові.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуальної задачі щодо визначення біогенних поліамінів у модельних розчинах, культурі клітин раку грудної залози лінії MCF-7 та зразках сироватки крові хворих на рак грудної залози. Згідно з отриманими результатами було зроблено наступні висновки.

1. За результатами порівняння ефективності визначення поліамінів за допомогою різних алгоритмів імунобіосенсорного аналізу, найкращі показники було отримано за допомогою прямого алгоритму аналізу. Визначення поліамінів прямим алгоритмом виявилось ефективнішим за конкурентний та «до насичення» на 17% і 35% відповідно.

2. Встановлено межі чутливості визначення поліамінів за допомогою оптичного біосенсора на основі явища поверхневого плазмонного резонансу в діапазоні 5-1000 нг.

4. Досліджено, що біосенсор на основі явища фотолюмінесценції оксиду цинку здатен визначати поліаміни в культурі клітин раку грудної залози у концентрації від 10 до 100 нг/мл.

5. Серед використаних біосенсорів найбільш ефективним виявився біосенсор на основі ефекту ППР який виявився ефективнішим на 14-30% відсотків у порівнянні з біосенсором на основі наночастинок ZnO

6. Результати перевірки ефективності розробленого біосенсора для визначення зразків хворих на рак грудної залози дозволили встановити високу специфічність імуноаналізу методом поверхневого плазмонного резонансу. Чутливість розробленої методики дозволила встановити концентрації поліамінів у хворих різних за віком та стадією захворювання.

7. Результати індикації поліамінів за допомогою розробленої методики біосенсорного аналізу на основі явища поверхневого

плазмонного резонансу підтверджують коректність використання експрес-методу і необхідність його запровадження у практичних умовах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білінський Б. Т. Еволюція клінічних підходів до проблеми раку грудної залози на фоні прогресу онкологічної науки / Б. Т. Білінський // Онкологія. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 282-285.
2. Бондаренко І.М. Рак грудної залози / І.М. Бондаренко, В.Ф. Завізіон, О.І. Асєєв. // Посібник для студентів 5-х – 6-х курсів медичних факультетів вищих медичних навчальних закладів та лікарів інтернів. Дніпропетровськ, вид-во “Нова Ідеологія», 2011. – 58 с.
3. Билинский Б. Т. Рак груди как общеврачебная проблема/ Б. Т. Билинский/ Междунар мед. ж. – 2002. – Т. 8, №4. – С. 111–117
4. Бураковский А. И. Методы иммунобиосенсорного анализа: принципиальные основы и возможности практического использования/ Бураковский А. И// Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008 – Т. 1. – С. 11 – 15.
5. Воронихина Л. Д. Содержание полиаминов в крови здоровых людей / Л. Д. Воронихина, В. Т. Демьянова, С. А. Ситников // Вопросы медицинской химии. – 1986. – Т. 32, № 2. – С. 43-45.
6. Герштейн, Е.С. Биологические маркеры рака молочной железы: методологические аспекты и клинические рекомендации / Е.С. Герштейн, Н.Е. Кушлинский // Маммология.—2005.—№ 1.—С.65—69
7. Грибач С. М. Клініко-біологічні особливості перебігу раку грудної залози у хворих похилого віку / С. М. Грибач, Н. В. Бородай, В. Ф. Чехун // Онкологія. - 2011. - Т. 13, № 4. - С. 260-265.
8. Дзядевич С. В. Амперометричні ферментні біосенсиори/ С. В. Дзядевич // Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ. – 2008. – С. 46 – 55.
9. Дзядевич С. В. Кондуктометричні ферментні біосенсиори: теорія, технологія, застосування/ С. В. Дзядевич // Біополімери і клітина. – 2005. – Т. 21, №2. – С. 93 – 102
10. Дыкман. Л. А. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы/ Л. А. Дыкман, Н. Г. Хлебцов/ Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2011. Т 3, № 2. – С 45-50.
11. Дышлюк А. В. Оптические биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса. Влияние расстояния между парой наночастиц на резонансную частоту и энергию связи системы/ А. В.

Дышлюк//Девятнадцатая Всероссийская конференция студентов- физиков и молодых ученых. – 2013. – С. 244 – 245

12. Егоров А. А. Химические сенсоры: классификация, принципы работы, области применения/ А. А. Егоров, М. А. Егоров, Ю. И. Царева// Физико-химическая кинетика в газовой динамике. – 2008 – Т. 6. – С. 9 – 15

13. Касаткин С. И. Биосенсоры на основе тонкопленочных магниторезистивных датчиков/ С. И. Касаткин, Н. П. Васильева, А. М. Муравьев // Автоматика и телемеханика. – 2010. – Т.1, №1. – С.174 – 186

14. Компанец О. Н. Портативные оптические биосенсоры для определения биологически активных и токсичных соединений/ О. Н. Компанец // Успехи физических наук. – 2004 – Т. 174, №6. – С. 686 – 690

15. Маєвський О. Є. Рак грудної залози. Сучасні методи діагностики з використанням онкомаркерів, специфічна імунотерапія / О. Є. Маєвський // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2014. – Т. 18, №2. – С. 635-6407

16. Маршутина Н.В., Сергеева Н.С. Серологические опухолевые маркеры в первичной диагностике и мониторинге больных раком молочной железы/ Н. В. Маршутина, Н. С. Сергеева/ Рос. онкол. журнал. — 2002. — № 4. — С. 45–48

17. Мечев Д. С. Гормони та пухлинні маркери: клініко-методичні аспекти (навчальний посібник)/ Д. С. Мечев, О. І. Москалец, О. С. Бондарук /Київ: ВПЦ «Медицина України». - 2007 . - 96 с

18. Мечев Д.С., Щербіна О.В. Радіоімунологічний аналіз в онкології (методичні рекомендації)/ Д. С. Мечев., О. В. Щербіна— К.: Фітосоціоцентр, 2002. — 20 с.

19. Москалец, А. И., Щербина, О. В. Опухолевые маркеры в лабораторной диагностике/ А. И Москалец, О. В Щербина/Лабораторна діагностика. – 2011. - №1. – С. 64-72

20. Осинський С. П. Метаболічне мікрооточення пухлинних клітин / С. Б. Осинський // Онкологія : вибрані лекції для студентів і лікарів / за ред. В. Ф. Чехуна. – К. : Здоров'я України, 2010. – С. 197-218.

21. Пивень Н. В. Иммунохимический анализ: научные основы, тенденции развития и возможности практического использования / Н. В Пивень/ Иммунопатология, аллергология, инфектология . – 2007. - №2. –С. 6-22.

22. Плахотник В. Ю. Сенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса и контроль диэлектрических свойств биологических сред/ В. Ю. Плахотник, Г. А. Поляков, Г. А. Долинский// Вісник СевНТУ Фізика і математика. – 2009 – Т. 99. – С. 82 – 85
23. Прилуцький М. П., Стародуб М.Ф. «Якісний та кількісний аналіз поліамнів сперміну та спермідину, як маркерів раку грудної залози з використанням біосенсора на основі ППР»// Наукові записки НАУКМА.- 2017., С.-62-68
24. Прилуцький М. П., Стародуб М. Ф., Феделеш-Гладинець М. І. Порівняння ефективності імунобіосенсорів на основі золота та наночастинок ZnO за аналізу рівнів сперміну в культурі клітин *in vitro*/ М. П. Прилуцький, М. Ф. Стародуб М. Ф., М. І. Феделеш-Гладинець // Біологічні системи теорія та інновації. – 2019. – Т. 10. - № 4. – С. 22-30
25. Семиглазов, В. Ф. Скрининг рака молочной железы / В. Ф. Семиглазов, В. Семиглазов, Г. Дамян/ Врач - 2010 - №11 - С.60-62
26. Сергеева Н. С. Общие представления о серологических биомаркерах и их месте в онкологии / Н. С. Сергеева, Н. В. Маршутина // Практическая онкология. – 2011. – Т. 12, № 4. – С. 147-154.].
27. Сивак, Л. А. Прогностичні фактори при раку грудної залози. Сучасний стан проблеми/ Л. А. Сивак, Н. О. Верьовкіна, С. А. Лялькін/ Клиническая онкология - 2014 - № 4 – С. 46-49
28. Солдаткін О. П. Вивчення шляхів оптимізації робочих характеристик потенціометричних біосенсорів/ О. П. Солдаткін // Биополимеры и клетка. – 1998 – Т. 14, №2. – С. 99 – 102
29. Сухой В. Ф. Опухолевые маркеры в клинической практике: Пособие для врачей / В. Ф. Сухой, В. С. Первый, Н. В. Сухой/ Днепропетровск: АРТ-ПРЕСС. – 2003 – 44с.
30. Тамкович, С. Н. Современные методы диагностики рака молочной железы/ С. Н. Тамкович, В. Е. Войцицкий, П. П. Лактионов/ Биомедицинская химия . – 2014 - Т. 60, №2. С. 141-160.
31. Турек М. Сенсоры на структурах электролит–диэлектрик–полупроводник, модифицированных ферментами/ М. Турек, М. Койсен, А. Погосян, А. Мулчандани, Д. Ванг, М. Д. Шёнинг// Институт нано- и биотехнологий, Аахенский университет прикладных наук. – 2008. – Т. 43, №2. – С. 128 – 134

32. Федоренко З. П. Рак в Україні, 2013-2014. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби / З. П. Федоренко, Ю. Й. Михайлович, Л.О. Гулак // Бюлетень Національного канцер-реєстру України. — 2015. — № 16. — 106 с.
33. Федоренко З. П. Риск развития рака молочной железы у женщин младших возрастных категорий в Украине //Довкілля та здоров'я. — 2016. — №. 1. С-25-27
34. Чекман І. С. Біосенсори: стан та перспективи наукових досліджень/ І. С. Чекман, Н. О. Горчакова // Наука та інновації. — 2008. — Т. 4, №3. — С. 75 – 79
35. Чехлова Т. К. Волноводные датчики концентраций веществ в газовых смесях и жидкостях/ Т. К. Чехлова., А. Г. Тимакин, К. А. Попов// Приборы и техника эксперимента. — 2002 — Т. 45. — С. 145 – 148
36. Щербіна О. В. Пухлинні маркери: роль у клінічній практиці/ О. В. Щербіна // Онкологія. — 2008. —Т. 10, № 2. — С. 269-273
37. Яценко Л. Д. Роль биомаркеров в патогенезе злокачественных образований/ Л. Д. Яценко // Мир медицины и биологии. — 2014. — Т. 10, №. 1 (43). — С. 192-195
38. Abrantes M. Adaptation of a Surface Plasmon Resonance Biosensor with Microfluidics for Use with Small Sample Volumes and Long Contact Times// M. Abrantes T. Magone, L. F. Boyd, P. Schuck / Anal. Chem. — 2001 — Vol. 7, No. 3 — P. 2828-2835
39. Bae D. H., Lane D. J., Jansson P. J., Richardson, D. R. The old and new biochemistry of polyamines/ D. H. Bae, D. J. Lane, P. J. Jansson, D. R. Richardson//Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. — 2018. — Vol. 1862, No.9, 2053-2068.
40. Balcerzak, W., Pokajewicz, K., Wieczorek, P. A useful procedure for detection of polyamines in biological samples as a potential diagnostic tool in cancer diagnosis/ W. Balcerzak, K. Pokajewicz, P. A. Wieczorek// Applied Cancer Research. — 2017. — Vol. 37, No. 1. <https://link.springer.com/article/10.1186/s41241-017-0032-x>
41. Bartos D. Direct determination of polyamines in human serum by radioimmunoassay / D. Bartos, R. A. Campbell, F. Bartos, D. P. Grettie // Cancer research. — 1975. — Vol. 35, No. 8. — P. 2056-2060
42. Byun J. A., Lee S. H., Jung B. H., Choi M. H., Chung B. C. Analysis of polyamines as carbamoyl derivatives in urine and serum by liquid

chromatography–tandem mass spectrometry/ J. A. Byun, S. H. Lee, B. H. Jung, M. H. Choi, B. C. Chung // Biomedical Chromatography.- 2008.- Vol. 22, No. 1.- P. 73-80.

43.Byun J. A., Choi M. H., Moon M. H., Kong G., Chung B. C. Serum polyamines in pre- and post-operative patients with breast cancer corrected by menopausal status/ J. A. Byun, M. H Choi M. H., M. H. Moon, G. Kong, B. C. Chung// Cancer Letters. – 2009. – Vol.273, No. 2. – P.300–304.

44. Bryce P. Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA and RNA Hybridization Adsorption onto DNA Microarrays/ Bryce P. Nelson, Timothy E. Grimsrud, Mark R. Liles/ Anal. Chem – 2001 – Vol.7, No. 3 – P. 1-7

45. Chaisiri P., Harper M. E., Griffiths K. Plasma spermine concentrations of patients with benign and malignant tumours of the breast or prostate./P. Chaisiri, M. E. Harper, K. Griffiths//Clinica Chimica Acta. – 1979. – Vol. 92, No. 2. – P. 273-282.

46. Campuzano S. An integrated electrochemical fructose biosensor based on tetrathiafulvalene-modified self-assembled monolayers on gold electrodes/ S. Campuzano, R. Galvez, M. Pedrero / Anal Bioanal Chem – 2003 – Vol.37, No.7 – P. 600–607

47. Cash K. J. A general electrochemical method for label-free screening of protein small molecule interactions/ K. J. Cash, F. Ricci, K. W. Plaxco //Chem. Commun. – 2009 – Vol. 4. – P. 6222 – 6224.

48.Casero R. A., Stewart T. M., Pegg A. E. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities/R. A. Casero, T. M. Stewart, A. E. Pegg A. E//Nature Reviews Cancer – 2018 – Vol. 18, No. 11 – P. 681-695.

49.Casero R. A (2006). Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. Nature Reviews. Drug Discovery. 6, 373–390.

50.Çelik, V. K. Kapancık S., Kaçan T., Kaçan S. B., Kılıçgün H (2017). Serum levels of polyamine synthesis enzymes increase in diabetic patients with breast cancer. Endocrine Connections. 6(8). 574–579

51.Cervelli M., Angelucci E., Germani F., Amendola R., Mariottini, P. Inflammation, carcinogenesis and neurodegeneration studies in transgenic animal models for polyamine research/ M. Cervelli, E. Angelucci, F. Germani, R. Amendola, P. Mariottini//Amino Acids. – 2014. – Vol. 46, No.3 – P. 521-530.

52. Chambers R. S. High-level generation of polyclonal antibodies by genetic immunization/ R. S. Chambers, S. A. Johnston / *Nat Biotechnol* – 2003 – Vol. 21, No. 10 – P. 88–92
53. Chou S. Development of an immunosensor for human ferritin, a nonspecific tumor marker, based on surface plasmon resonance/ Win-Lin Hsu, Jing-Min Hwang , Chien-Yuan Chen / *Biosensors and Bioelectronics* – 2004 – No. 19 – P. 999–1005
54. Chung J. W. Immunosensor with a controlled orientation of antibodies by using NeutrAvidin-protein A complex at immunoaffinity layer/ J. W Chung, J. M Park, R. Bernhardt, J. C. Pyun// *Biotechnol.* – 2006. – Vol. 126. – P. 325 – 333
55. Cooke, M., Leeves, N., & White, C. (2003). Time profile of putrescine, cadaverine, indole and skatole in human saliva. *Archives of Oral Biology*, 48(4), 323-327.
56. Cooper M. Label-free screening of bio-molecular interactions/ M. Cooper /*Anal Bioanal Chem* – 2003 – Vol. 37, No.7 - P. 834–842
57. Cretich M. A new polymeric coating for protein microarrays/ M. Cretich, G. Pirri, F. Damin / *Analytical Biochemistry* – 2004 – Vol. 33, No.2 – 2004 - P. 67–74
58. Criss, W. E. A review of polyamines and cancer (2003). *Turkish Journal of Medical Sciences*. 33 (4), 195–205.
59. Demchenko A. V. Thermal biosensor for detecting nonylphenol in the environment/ Demchenko A. V., Melnik V. G., Starodub N. F// *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal.* – 2007 – Vol. 79(5). – P. 212 – 215
60. Dillon P. P. Development and use of antibodies in surface plasmon resonance-based immunosensors for environmental monitoring/ P. P. Dillon, S. J. Daly, A. J. Killard, O’Kennedy R.// *Int. J. Environ. An.* – 2003. – Vol. 83. – P. 525 – 543.
61. Driskell J. D. Labeled gold nanoparticles immobilized at smooth metallic substrates: systematic investigation of surface plasmon resonance and surface-enhanced scattering/ J. D. Driskell, R. J. Lipert, M. D. Porter// *Phys. Chem. B.* – 2006. – Vol. 110. – P. 17444 – 17451
62. Elettigerra, U., Martinez-Perdiguero, J., Barderas, R., Pingarrón, J. M., Campuzano, S., & Merino, S. (2016). Surface plasmon resonance immunosensor

for ErbB2 breast cancer biomarker determination in human serum and raw cancer cell lysates. *Analytica chimica acta*, 905, 156-162.

63. Fu, S., Xiao, C., Zhao, W., & Yu, X. (2012). Polyamines analysis by HPLC and their application as tumor markers. *Frontiers Biosci (Elite Ed.)*, 4, 1795-801

64. Fujiwara K. Preparation of polyamine antibody and its use in enzyme immunoassay of spermine and spermidine with β -D-galactosidase as a label/ K. Fujiwara, H. Asada, T. Kitagawa et al. // *Journal of immunological methods*. – 1983. – Vol. 61, No. 2. – P. 217-226

65. Gerner, E.W. Meyskens F. L. (2004). Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews. Cancer*. 4, 781–789.

66. Green M. C. Monoclonal antibody therapy for solid tumors/ M. C. Green, J. L. Murray, G. N. Hortobagyi / *Cancer Treat Rev* - 2000. - No. 26 – P. 269–86

67. Guerra, G. P., Rubin, M. A., Mello, C. F. (2016). Modulation of learning and memory by natural polyamines. *Pharmacological research*. 112, 99–118.

68. Gugliucci A. Polyamines as clinical laboratory tools / A. Gugliucci / *Clinica chimica acta*. – 2004. – Vol. 344. – No. 1. – P. 23-35.

69. Haake H. Label-free detection of biomolecular interaction by optical sensors / H. Haake, A. Schütz, G. Gauglitz / *Fresenius J Anal Chem* – 2000 - Vol 36. No.6 - P. 576–585

70. Häkkinen, M. R., Roine, A., Auriola, S., Tuokko, A., Veskimäe, E., Keinänen, T. A., ... & Vepsäläinen, J. (2013). Analysis of free, mono- and diacetylated polyamines from human urine by LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 941, 81-89.

71. Hiramatsu K. Development of a sensitive and accurate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system that can replace HPLC analysis for the determination of N¹, N¹²-diacetylspermine in human urine / K. Hiramatsu, H. Miura, S. Kamei, et al. // *The Journal of Biochemistry*. – 1998. – Vol. 124. – No. 1. – P. 231-236

72. Homola J. Surface plasmon resonance sensors: review/ J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz// *Sens. Actuat. B-Chem*. – 1999 – Vol. 54. – P. 3 – 15

73. Kingsnorth A. N. Polyamines in breast cancer/ H. M. Wallace, N. J. Bundred, J. M. J Dixon/ *British journal of surgery*. – 1984. – Vol 71, No. 5. - P. 352-356

74. Kiran, K., Kumar, S., & Singh, R. (2018). Tumour marker and diagnosis of cancer. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 12(3), 14-20.
75. Lange K. Surface acoustic wave biosensors: a review/ K. Lange, B. E. Rapp, M. Rapp // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2008. – Vol. 391(5). – P. 1509 – 1519
76. Lee S. H. Estrogens and polyamines in breast cancer: their profiles and values in disease staging / S. H. Lee, S. O. Kim, H. Lee, B. C. Chung // *Cancer letters*. – 1998. – Vol. 133, No. 1. – P. 47-56
77. Levêque, J., Foucher, F., Bansard, J. Y., Havouis, R., Grall, J. Y., & Moulinoux, J. P. (2000). Polyamine profiles in tumor, normal tissue of the homologous breast, blood, and urine of breast cancer sufferers. *Breast cancer research and treatment*, 60(2), 99-105.
78. Mandal, S., Mandal, A., Johansson, H. E., Orjalo, A. V., & Park, M. H. (2013). Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(6), 2169-2174.
79. Minois N.. Polyamines in aging and disease / N. Minois, D. Carmona-Gutierrez, F. Madeo / *Aging (Albany NY)*. – 2011. – Vol. 3. – No. 8. – P. 716.
80. Mitchell J. Small molecule immunosensing using surface plasmon resonance/ J. Mitchell//*Sensors*. – 2010. – Vol. 10(8). – P. 7323 – 7346.
81. Monteiro, J. P., de Oliveira, J. H., Radovanovic, E., Brolo, A. G., & Girotto, E. M. (2016). Microfluidic plasmonic biosensor for breast cancer antigen detection. *Plasmonics*, 11(1), 45-51.
82. Nowotarski, S. L. Woster P. M., Casero R. A. (2013) Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 15 (3), 1–21
83. O`Connell P. J. Future trends in biosensors research. P. J. O`Connell, G. G. Guilbault // *Anal. Lett.* — 2001. — Vol. 34(7). – P. 1063—1078
84. Persson, L., & Rosengren, E. (1989). Increased formation of N1-acetylspermidine in human breast cancer. *Cancer letters*, 45(2), 83-86.
85. Prentki M. Ca²⁺, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion/ M. Prentki, F. M. Matschinsky// *Physiological reviews*. – 1987. – Vol. 67(4) – P. 1185 – 1248

86. Park, M. H., & Igarashi, K. (2013). Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases. *Biomolecules & therapeutics*, 21(1), 1-9.
87. Prylutskyi M, Starodub N, Bilko N. Determination of the Concentration of Polyamines with SPR-based Immune Biosensor for Early Diagnostics of Breast Cancer /M. Prylutskyi, N. Starodub, N. Bilko N.// *Biosensors&Bioelectronics*.- 2016.- Vol.7, No. 4 - P.1-10
88. Prylutskyi M. Starodub N., Bilko N. Express control of levels of polyamines by immune biosensor based on SPR/ M. Prylutskyi, N. Starodub, N. Bilko N.//*Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv-Problems of Physiological Functions Regulation*. – 2018. – Vol. 25, No. 2. – P. 59-63
89. Prylutskyi, M. P., Bilko, N. M., Starodub, N. F. Detection of biogenic polyamines in blood of patients with breast cancer /Prylutskyi, M. P., Bilko, N. M., Starodub, N. F.// *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. – 2019. – Vol. 10, No. 2 – P. 257-263.
90. Prylutskyi M. P., Snarodub N. F. Polyamine analysis in solution and culture in vitro using the immunobiosensor on the basis of ZnO nanoparticles for early diagnostics of oncological diseases/ M. Prylutskyi, N. Starodub, N. Bilko// *Experimental oncology*. – 2019. – Vol. 41, No.4 - P. 1- 3
91. Qi C. Label-free Biosensors for Health Applications // *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity/ C. Qi, G. Gao, G. Jin // InTech: book edited by Pier Andrea Serra*. – 2011. – P. 165-169.
92. Reddy, P. J., Sadhu, S., Ray, S., Srivastava S. (2012). Cancer Biomarker Detection by Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Clinics in Laboratory Medicine*. 32(1), 47–72
93. Rich R. L. Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis/ R. L. Rich, D. G. Myszka // *Analytical biochemistry*. – 2007. – Vol. 361(1). – P. 1 – 6.
94. Soda, K., Dobashi, Y., Kano, Y., Tsujinaka, S., & Konishi, F. (2009). Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Experimental gerontology*, 44(11), 727-732.
95. Starodub N. F. Efficiency of biosensors in environmental monitoring // *Book of series in sensors: Portable Biosensing of Food Toxicants and Environmental Pollutants*, London, NewYork – CRC Press, Taylor&Francis Croup Boca Raton. – 2013. – P. 515-560.

96. Stojanović, I., van Hal, Y., van der Velden, T. J., Schasfoort, R. B., & Terstappen, L. W. (2016). Detection of apoptosis in cancer cell lines using Surface Plasmon Resonance imaging. *Sensing and bio-sensing research*, 7, 48-54.
97. Takayama T. Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry / T. Takayama, H. Tsutsui, I. Shimizu et al. // *Clinica Chimica Acta*. – 2016. – Vol. 452. – P. 18-26
98. Tothill I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis / I. E. Tothill / *Seminars in cell & developmental biology*. – Academic Press, 2009. – Vol. 20, No. 1. – P. 55-62
99. Van Der Merwe P. A. Surface plasmon resonance. *Protein-Ligand Interactions: Hydrodynamics and Calorimetry*. – 2001 – P. 137 – 170
100. Yang, M., Yi, X., Wang, J., & Zhou, F. (2014). Electroanalytical and surface plasmon resonance sensors for detection of breast cancer and Alzheimer's disease biomarkers in cells and body fluids. *Analyst*, 139(8), 1814-1825.
101. Zeng S. A review on functionalized gold nanoparticles for biosensing applications/ S. Zeng// *Plasmonics*. – 2011. – Vol. 6(3). – P. 491–506

ДОДАТКИ

Додаток А

Патент на корисну модель



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118303** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/483 (2006.01)
G01N 33/547 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 21/66 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 03303	(72) Винахідник(и): Прилуцький Максим Петрович (UA), Стародуб Микола Федорович (UA), Білько Денис Іванович (UA)
(22) Дата подання заявки: 06.04.2017	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ "КИЄВО-МОГИЛЯНСЬКА АКАДЕМІЯ", вул. Григорія Сковороди, 2, м. Київ, 04070 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.07.2017	(74) Представник: Ломаковська Тетяна Романівна, ресстр. №272
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2017, Бюл.№ 14	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ПОЛІАМІНІВ ДЛЯ ЕКСПРЕСНОЇ ДІАГНОСТИКИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ В УМОВАХ IN VITRO

(57) Реферат:

Спосіб визначення рівня поліамінів для експресної діагностики раку молочної залози в умовах in vitro люмінесцентним методом, із використанням біосенсора у вигляді жорсткої підкладки-носія, поверхня якої оброблена розчином наночастинок оксиду цинку, включає нанесення на підкладку-носіє біоселективного шару на основі антитіла, специфічного до досліджуваної біологічної речовини-антигену, та детекцію, за допомогою лазера, інтенсивності фотолюмінесценції, що виникає при утворенні кон'югату антитіло-антиген. Діагностування розвитку раку молочної залози здійснюють методом визначення концентрації щонайменше двох видів біогенних поліамінів в суспензії культури клітин раку молочної залози людини MCF-7. При цьому для створення біоселективного шару додатково модифікують поверхню підкладки-носія біосенсора розчином білка А і попередньо досліджують модельні розчини біогенних поліамінів в різних концентраціях як антигени, шляхом їх нанесення на біоселективний шар підкладки-носія біосенсора, та визначення залежності рівня люмінесцентного сигналу від рівня концентрації відповідного антигену. Після цього досліджують різні концентрації суспензії культури клітин раку молочної залози людини MCF-7, яку використовують як речовину-антиген, шляхом її нанесення на біоселективний шар підкладки-носія біосенсора, і, за рівнем люмінесцентного сигналу біосенсора, при опроміненні в діапазоні довжини хвилі 375-380 нм, оцінюють рівень концентрації біогенних поліамінів у відповідному розчині суспензії культури клітин раку молочної залози, на основі попередньо визначеної залежності у модельних розчинах, та, за рівнем накопичення поліамінів, роблять висновок про початок малигнізації.

Додаток Б

Акт впровадження у навчальний процес



УКРАЇНА

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «КИЄВО-МОГИЛЯНСЬКА АКАДЕМІЯ»

04070, м. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, тел.: (044) 425-60-59, факс.: (044) 463-67-83, www.ukma.edu.ua

15.10.2020 № 13/1026

на № _____

АКТ

про впровадження результатів дослідження
«Розробка біосенсорних платформ та базових алгоритмів аналізу для експресної
діагностики раку грудної залози людини в умовах *in vitro*»
на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія
ПРИЛУЦЬКОГО МАКСИМА ПЕТРОВИЧА

Результати дисертаційного дослідження Прилуцького Максима Петровича на тему:
«Розробка біосенсорних платформ та базових алгоритмів аналізу для експресної
діагностики раку грудної залози людини в умовах *in vitro*» впроваджено у навчальний
процес магістерської програми «Лабораторна діагностика біологічних систем», кафедри
лабораторної діагностики біологічних систем, факультету природничих наук НаУКМА.

Впровадження результатів дисертаційного дослідження Прилуцького М. П.
сприяло розширенню та поглибленню знань майбутніх фахівців.

Апробація результатів дослідження підтверджує їх теоретичну і практичну
спрямованість, доводить доцільність подальшого їх впровадження у навчальний процес
кафедри лабораторної діагностики біологічних систем.

Акт про впровадження результатів дисертаційного дослідження обговорено та
затверджено за протоколом № 18 від «21» вересня 2020 року.

Завідувач кафедри лабораторної
діагностики біологічних систем
д. мед. н., професор



Білько Н. М.

001065

Акт впровадження у роботу діагностичної лабораторії

ТОВ «Альфа Лабсервіс» м. Харків, вул. Костомарівська, 15/17.
тел/факс: (057) 700-23-66; (050) 540-23-99; (057) 761-09-17
Ліцензія МОЗ України АЕ №282103 від 08.01.2014
Свідчення про атестацію №100-396/2015 від 30.12.2015
www.alab.com.ua info@alab.com.ua



ЦЕНТР ЛАБОРАТОРНОЇ МЕДИЦИНИ

«АЛЬФА-ЛАБСЕРВІС»

вул. Костомарівська, 15/17, 61002, м. Харків
email:

тел. +380505402399
код ЄДРПОУ: 35944210

№ 1412-18 від 14.12.2018р.

АКТ

про впровадження результатів дослідження
«Розробка біосенсорних платформ та базових алгоритмів аналізу для експресної
діагностики раку грудної залози людини в умовах *in vitro*»
на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія
ПРИЛУЦЬКОГО МАКСИМА ПЕТРОВИЧА

Результати дисертаційної роботи Прилуцького Максима Петровича з теми
«Розробка біосенсорних платформ та базових алгоритмів аналізу для експресної
діагностики раку грудної залози людини в умовах *in vitro*» впроваджено у робочий процес
Центру лабораторної медицини «Альфа Лабсервіс» для діагностики онкологічних
захворювань, а саме раку молочної залози, з метою полегшення та удосконалення засобів
діагностики.

Впровадження розробок і рекомендацій Прилуцького М. П. дозволило спростити,
полегшити і покращити процес діагностики раку молочної залози пацієнтів Центру
лабораторної медицини «Альфа Лабсервіс».

Апробація результатів дослідження підтверджує їх теоретичну і практичну
спрямованість, доводить доцільність подальшого їх впровадження у робочий процес з
метою підвищення ефективності і якості діагностики онкологічних захворювань, яка
проводиться у Центрі лабораторної медицини «Альфа Лабсервіс».

Акт про впровадження результатів дисертаційного дослідження обговорено та
затверджено за протоколом № від «14» грудня 2018 року.

Довідка видана для пред'явлення у спеціалізовану вчену раду Д26.002.28,
Національного технічного університету України «КПІ ім. Ігоря Сікорського».

Директор
Центру лабораторної медицини
«Альфа Лабсервіс»
Лікар-лаборант вищої категорії
клінічної біохімії



Шуляк Людмила Іванівна